

**Aus der Inneren Medizin I  
Klinik für Hämatologie, Onkologie,  
Klinische Immunologie und Rheumatologie  
Universitätsklinikum des Saarlandes  
Direktor: Prof. Dr. med. Pfreundschuh**

---

**Entwicklung der GPI-defizienten Zellfraktionen,  
der Hämolysenparameter und der Transfusionsbedürftigkeit  
bei Patienten mit paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie  
unter Eculizumabtherapie**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der  
Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes  
2010**

**Vorgelegt von  
Anja Christina Blömer, geb. Schlüter, geboren am 04.07.1981 in Hamm**

---

# Inhaltsverzeichnis

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Inhaltsverzeichnis .....</b>   | <b>2</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>1 Zusammenfassung .....</b>  | <b>7</b>  |
| 1.1 Zusammenfassung.....  | 7         |
| 1.2 Summary .....   | 8         |
| <b>2 Einleitung .....</b>   | <b>9</b>  |
| 2.1 Pathophysiologie.....   | 10        |
| 2.1.1 Das defekte PIG-A-Gen und seine Folgen .....  | 10        |
| 2.1.2 Klonale Expansion GPI-defizienter Zellen .....  | 11        |
| 2.2 Klinische Manifestation .....   | 13        |
| 2.3 Diagnostik.....   | 16        |
| 2.4 Therapiestrategien.....   | 18        |
| 2.4.1 Konventionelle Therapiestrategien .....   | 18        |
| 2.4.2 Neue Therapiestrategien.....  | 19        |
| <b>3 Material und Methodik.....</b>   | <b>22</b> |
| 3.1 Material .....  | 22        |
| 3.2 Studienpatienten.....   | 23        |
| 3.3 Studienablauf.....  | 25        |
| 3.4 Ein- und Ausschlusskriterien .....  | 27        |
| 3.5 Durchflusszytometrie .....  | 29        |
| 3.5.1 Standard Vollblut-Oberflächenfärbung .....  | 30        |
| 3.5.2 Messeinstellungen .....   | 32        |
| 3.5.3 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten.....  | 33        |
| 3.6 Bestimmung der Standardlaborparameter.....  | 37        |
| 3.7 Statistische Auswertung.....  | 37        |
| <b>4 Ergebnisse .....</b>   | <b>38</b> |
| 4.1 Entwicklung der GPI-defizienten Erythrozyten unter Eculizumabtherapie .....   | 38        |
| 4.2. Entwicklung der GPI-defizienten Granulozyten unter Eculizumabtherapie.....   | 41        |
| 4.3 Entwicklung der GPI-defizienten Erythrozyten im Vergleich zur Entwicklung der GPI-defizienten Granulozyten unter Eculizumabtherapie ..... | 44        |

---

|  |           |
|--|-----------|
| 4.4 Entwicklung der GPI-defizienten Retikulozyten unter Eculizumabtherapie.....  | 45        |
| 4.5 Entwicklung der absoluten Retikulozytenwerte unter Eculizumabtherapie.....   | 48        |
| 4.6 Entwicklung der LDH-Werte unter Eculizumabtherapie.....  | 51        |
| 4.7 Entwicklung des Gesamtbilirubins unter Eculizumabtherapie.....   | 53        |
| 4.8 Entwicklung der Hb-Werte unter Eculizumabtherapie .....  | 55        |
| 4.9 Entwicklung der Transfusionshäufigkeit unter Eculizumabtherapie .....  | 58        |
| <b>5 Diskussion.....</b>   | <b>60</b> |
| 5.1 Entwicklung der GPI-defizienten Erythrozyten unter Eculizumabtherapie .....  | 60        |
| 5.2 Entwicklung der GPI-defizienten Granulozyten unter Eculizumabtherapie.....   | 65        |
| 5.3 Entwicklung der GPI-defizienten Erythrozyten im Vergleich zur Entwicklung der<br>GPI-defizienten Granulozyten unter Eculizumabtherapie ..... | 66        |
| 5.4 Entwicklung der GPI-defizienten Retikulozyten unter Eculizumabtherapie.....  | 66        |
| 5.5 Entwicklung der absoluten Retikulozytenwerte unter Eculizumabtherapie.....   | 68        |
| 5.6 Entwicklung der LDH-Werte unter Eculizumabtherapie.....  | 69        |
| 5.7 Entwicklung des Gesamtbilirubins unter Eculizumabtherapie .....  | 70        |
| 5.8 Entwicklung der Hb-Werte unter Eculizumabtherapie .....  | 71        |
| 5.9 Entwicklung der Transfusionshäufigkeit unter Eculizumabtherapie .....  | 72        |
| 5.10 Schlussfolgerungen.....   | 72        |
| 5.11 Perspektiven.....   | 73        |
| <b>6 Literaturverzeichnis.....</b>   | <b>76</b> |
| <b>7 Danksagungen.....</b>   | <b>84</b> |
| <b>8 Lebenslauf .....</b>  | <b>85</b> |
| <b>9 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis .....</b>   | <b>87</b> |
| 9.1 Tabellenverzeichnis .....  | 87        |
| 9.2 Abbildungsverzeichnis .....  | 88        |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|           |  |
|-----------|--|
| AA        | aplastische Anämie                             |
| Abb.      | Abbildung                                      |
| a.e.      | am ehesten                                     |
| AK        | Antikörper                                     |
| AML       | akute myeloische Leukämie                      |
| ATG       | Antithymozytenglobulin                         |
| B         | Vollblut                                       |
| Bsp.      | Beispiel                                       |
| CD        | cluster of differentiation                     |
| DAF       | decay-accelerating factor                      |
| d.h.      | das heißt                                      |
| dl        | Deziliter                                      |
| DPD       | Deoxypyridinolin                               |
| ED        | Erstdiagnose                                   |
| EDTA      | Ethylendiamintetraacetat                       |
| EK        | Erythrozytenkonzentrat                         |
| EU        | Europäische Union                              |
| F         | Frauen   |
| FITC      | Fluorescein-5-Isothiocyanat                    |
| FLAER     | fluorescently labeled aerolysin                |
| FSC       | forward scatter                                |
| GFR       | Glomeruläre Filtrationsrate                    |
| FACS      | fluorescence activated cell sorting            |
| FL        | fluorescence                                   |
| g         | Gramm  |
| GPI-Anker | Glykosylphosphatidylinositol-Anker             |
| Hb-Wert   | Hämoglobinwert                                 |
| IFCC      | International Federation of Clinical Chemistry |
| Ig        | Immunglobulin                                  |
| LDH       | Laktatdehydrogenase                            |

|            |   |
|------------|---|
| LOG        | Logarithmus   |
| Li-Heparin | Lithium-Heparin   |
| Lin        | linear  |
| M          | Männer  |
| MCP        | membrane-cofactor-protein   |
| MDS        | myelodysplastisches Syndrom   |
| MAC        | Membranangriffskomplex  |
| mg         | Milligramm  |
| min        | Minute  |
| ml         | Milliliter  |
| µl         | Mikroliter  |
| MIRL       | membrane inhibitor of reactive lysis  |
| nl         | Nanoliter   |
| NO         | Stickstoffmonoxid   |
| o. g.      | oben genannt  |
| p          | Signifikanzniveau (2-seitig)  |
| P          | Plasma  |
| Pat.       | Patient   |
| PBS        | Dulbecco's Phosphat Puffer  |
| PDE-5      | Phosphodiesterase 5   |
| PE         | R-Phycoerythrin   |
| PIG-A-Gen  | Phosphatidyl-Inositol-Glykan-A-Gen  |
| PNH        | paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie   |
| rpm        | Umdrehungen pro Minute  |
| s.         | siehe   |
| SHEPHERD   | Safety in hemolytic PNH patients treated with Eculizumab: A multi-center open-label research design study |
| SSC        | side scatter  |
| Tab.       | Tabelle   |
| TF         | tissue factor   |
| TIA        | transitorische ischämische Attacke  |

|         |  |
|---------|--|
| TRIUMPH | Transfusion reduction efficacy and safety<br>clinical investigation, randomized, multi-<br>center, double-blind, placebo-controlled,<br>using Eculizumab in paroxysmal nocturnal<br>hemoglobinuria |
| U       | Unit   |
| Z.n.    | Zustand nach   |

# 1 Zusammenfassung

---

## 1.1 Zusammenfassung

Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH) ist eine erworbene klonale Erkrankung der hämatopoetischen Stammzelle und tritt mit einer Inzidenz von etwa ein bis zehn Fällen pro eine Million Einwohner auf. Die Erkrankung entsteht durch die somatische Mutation des Phosphatidyl-Inositol-Glykan-A (PIG-A)-Gens mit konsekutiver Expansion eines anormalen Klons, der Proteine, die normalerweise durch den Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Zelle verbunden sind, nicht exprimiert. Die klinische Manifestation der PNH ergibt sich aus der fehlenden Expression der GPI-defizienten Proteine CD 55 und CD59, die kernlose Blutzellen gegenüber der Komplement-induzierten Lyse schützen. Führende Merkmale der Erkrankung sind intravasale Hämolyse, Thrombophilie, sowie eine Assoziation zur aplastischen Anämie. Eine neue Therapiestrategie, die Hemmung des terminalen Komplementsystems durch den monoklonalen anti-C5-Antikörper Eculizumab, hat die Therapie der PNH revolutioniert und bildet die Grundlage der vorliegenden Arbeit.

Wir untersuchten über einen Zeitraum von 34 Wochen die Entwicklung der GPI-defizienten Granulozyten, Erythrozyten und Retikulozyten von sieben mit Eculizumab behandelten PNH-Patienten. Die Rekrutierung dieser Patienten erfolgte in zwei Phase-III-Therapiestudien, die zur Zulassung von Eculizumab in der EU im Juni 2007 führten. Bei unseren durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde keine signifikante Änderung der GPI-defizienten Granulozytenfraktion beobachtet, was sich durch den Schutz der kernhaltigen Zellen vor dem Angriff durch das Komplementsystem erklären lässt. Trotz einer fehlenden Zunahme der PNH-Retikulozyten unter Eculizumabtherapie waren insgesamt deutlich höhere Anteile an defizienten Retikulozyten als an defizienten Erythrozyten zu finden. Bei einigen Studienteilnehmern wurde ein Anstieg der GPI-defizienten Erythrozytenfraktion beobachtet. Der bei unseren Patienten beobachtete signifikante Rückgang der LDH, der Anstieg des Hb-Wertes und die bei fünf von sieben Patienten erreichte Transfusionsfreiheit sprechen für die Hemmung der intravasalen Hämolyse. Die gleichzeitig persistierende Hyperbilirubinämie und Retikulozytose sind jedoch nicht mit einer vollständigen Unterbindung der Hämolyse vereinbar und können bei extravasalen Formen der Hämolyse vorkommen.

## 1.2 Summary

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is an acquired clonal disorder of the hematopoietic stem cell with an incidence of one to ten per million inhabitants. It arises due to a somatic mutation of the phosphatidylinositolglycan class A (PIG-A) gene and the subsequent expansion of an abnormal clone that does not express proteins normally anchored to the cell via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. The clinical features of PNH result from the lack of the GPI-deficient proteins CD55 and CD59 that serve to protect anucleate blood cells from complement-mediated attack. Main symptoms of the disease are intravascular hemolysis, thrombophilia as well as an increased association with aplastic anemia. A new therapeutic strategy, the inhibition of terminal complement by the monoclonal anti-C5-antibody Eculizumab has revolutionized the therapy of PNH and forms the basis of this work.

We assessed the development of GPI-deficient granulocytes, erythrocytes and reticulocytes of seven PNH patients who were treated with Eculizumab during a period of 34 weeks. The patients were recruited in two phase-III therapy studies, which led to the approval of Eculizumab in the EU in June 2007. Our flow cytometric analysis showed no significant change of GPI-deficient granulocytes which is due to the fact that anucleate blood cells are protected against a complement-mediated attack. Although the fraction of PNH reticulocytes did not increase under treatment with Eculizumab, a higher proportion of deficient reticulocytes than of deficient erythrocytes was found. Some of the participants of our study showed an increase of GPI-deficient erythrocytes. The statistically significant decrease of LDH, the increase of hemoglobin rate and the independence of transfusion requirements in five of seven patients militate in favor of the inhibition of intravascular hemolysis. However, concomitant persisting hyperbilirubinemia and reticulocytosis are not compatible with complete prevention of hemolysis and can be found in forms of extravascular hemolysis.



## 2 Einleitung

---

Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH) wurde erstmals im Jahre 1882 von Paul Strübing als klinisches Syndrom mit Hämoglobinurie nach dem Schlaf beschrieben (Strubing, 1882). Etwa 30 Jahre später berichteten Marchiafava und Micheli über diese Form der hämolytischen Anämie, weshalb die Erkrankung auch als Marchiafava-Micheli-Syndrom bezeichnet wird (Marchiafava et al., 1911). Im Jahre 1937 konnte Ham nachweisen, dass die Hämoglobinurie auf eine anormale Sensitivität der roten Blutzellen gegenüber der hämolytischen Aktivität des körpereigenen Komplementsystems zurückzuführen ist (Ham et al., 1938). Diese Entdeckung war ein Meilenstein in der Geschichte der PNH, da man nun erstmalig mithilfe eines diagnostischen Tests die PNH von anderen hämolytischen Anämien unterscheiden konnte. Viele Hämatologen und Immunologen waren und sind seitdem von dem einzigartigen Erscheinungsbild fasziniert, bei dem körpereigene Zellen vom Komplementsystem zerstört werden.

Als einzige erworbene korpuskuläre hämolytische Anämie tritt die PNH mit einer geschätzten Inzidenz von etwa ein bis zehn Fällen pro eine Million Einwohner auf (Rosse, 1996; Luzzato et al., 1997). Die Erkrankung kann in jedem Alter vorkommen, wird zwischen dem 30.-50. Lebensjahr jedoch am häufigsten diagnostiziert (Ware et al., 1991). Männer und Frauen sind gleichermaßen betroffen. Da die PNH einen negativen Einfluss auf das mittlere Überleben hat, lebt 10 bis 15 Jahre nach Erkrankungsbeginn nur noch die Hälfte der Patienten (Hillmen et al., 1995; Socié et al., 1996). Eine spontane Remission der Erkrankung ist selten, wird in der Literatur aber immer wieder beschrieben (Hillmen et al., 1995; Li et al., 1999).

Bei der PNH handelt es sich um eine erworbene Erkrankung der hämatopoetischen Stammzelle, die durch eine Mutation des Phosphatidyl-Inositol-Glykan (PIG)-A-Gens hervorgerufen wird (Ostendorf et al., 1995; Ware et al., 1994 a). Die Mutation des PIG-A-Gens führt zu einem defekten Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit fehlender Expression der Oberflächenmoleküle CD55 und CD59, woraus letztendlich eine erhöhte Komplementsensitivität mit Hämolyse der roten Blutzellen resultiert (Pangburn et al., 1983; Schubert et al., 1991; Ostendorf et al., 1994; Nakakuma et al., 1996 a; Nakakuma et al., 1996 b).

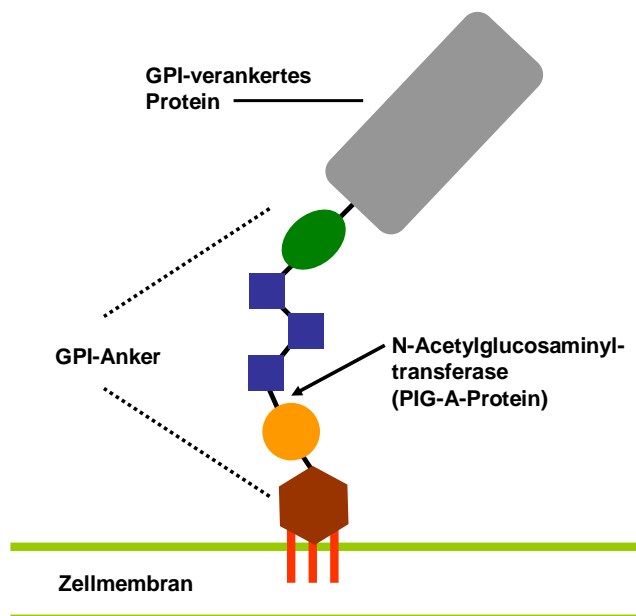
## 2.1 Pathophysiologie

### 2.1.1 Das defekte PIG-A-Gen und seine Folgen

Die PNH wird durch die klonale Expansion der hämatopoetischer Stammzellen mit Mutation des Phosphatidyl-Inositol-Glykan-A-Gens (PIG-A) verursacht (Miyata et al., 1994; Bessler et al., 1994; Lida et al., 1994; Ostendorf et al., 1995; Nishimura et al., 1999; Ware et al., 1994 b). Das PIG-A-Gen verschlüsselt das Protein Acetylglucosaminyltransferase, welches für die Synthese von GPI-Ankermolekülen erforderlich ist (Hillmen et al., 1993). Das Gen ist auf dem kurzen Arm des X Chromosoms lokalisiert (Takeda et al., 1993., Hong et al., 1997). Die Lokalisation auf dem X Chromosom bewirkt, dass eine einzige somatische Mutation den Verlust oder die Änderung des kompletten Genproduktes der Zelle herbeiführt (Kinoshita et al., 1985; Ware et al., 1994 a; Bessler et al., 1994 a; Takeda et al., 1993). Männer haben nur ein X-Chromosom, bei Frauen wird das zweite durch die so genannte Lyonisierung inaktiviert. Es ist keine erbliche Form der GPI-Anker Defizienz bekannt (Keller et al., 1999), da signifikante Keimbahnmutationen des PIG-A-Gens bereits während der Embryogenese zum Tode führen (Endo et al., 1996). PIG-A mutierte Zellen kommen auch bei Gesunden vor (Hu et al., 2005; Brodsky et al., 2006). Eine große Vielfalt von Anomalien des Gens ist in den Blutzellen Betroffener identifiziert worden. Zu den häufigsten Mutationen gehören die Deletion oder Insertion von einer oder zwei Basen (Nishimura et al., 1998). Obwohl die gleichen Mutationen bei mehreren Patienten gefunden wurden, gibt es für diese innerhalb der Gene keine Prädispositionsstelle. Diese Beobachtung und die Tatsache, dass etwa die Hälfte der PNH-Patienten mehr als einen anormalen Klon aufweist (Hu et al., 2005), führten zu der Überlegung, dass eine generelle genetische Instabilität zum vermehrten, zufälligen Auftreten der somatischen Mutationen des PIG-A-Gens beitragen könnte (Purow et al., 1999).

Über den GPI-Anker sind verschiedene Oberflächenproteine, so auch die Komplement-regulierenden Oberflächenproteine CD55 (decay-accelerating factor [DAF]) und CD59 (membrane inhibitor of reactive lysis [MIRL]) mit der Zellmembran verbunden (Nicholson-Weller et al., 1985; Davies et al., 1989). DAF inhibiert die C3 Konvertase, wohingegen MIRL als Inhibitor der terminalen Komplementkaskade die Formierung des Membranangriffskomplexes C5b-C9 verhindert. Bei der PNH werden diese Oberflächenmoleküle gar nicht oder nur teilweise von den betroffenen klonalen Zellen

exprimiert, woraus eine erhöhte Sensitivität gegenüber der Komplementkaskade mit Lyse der Erythrozyten resultiert (Nicholson-Weller et al., 1983; Kinoshita et al., 1985). Der Nachweis, dass das Fehlen von CD59 für die charakteristischen Symptome der PNH wie etwa für die Hämolyse verantwortlich ist, konnte anhand eines Patienten mit einem isolierten Mangel an CD59 erbracht werden (Yamashina et al., 1990). Hier zeigte sich wie bei der PNH eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem alternativen Weg der Komplementkaskade mit dem klinischen Leitsymptom der Hämolyse. Der isolierte Defekt von CD55 hingegen bewirkte keine ausgeprägte Hämolyse (Holguin et al., 1992). Kernhaltige Zellen, die das transmembran verankerte membrane-cofactor-protein (MCP; CD46) tragen, sind von der Hämolyse durch das Komplementsystem nicht betroffen (Seya et al., 1988).



**Abb. 1. Aufbau des GPI-Ankers.** Der GPI-Anker ist ein transmembranes Glykoproteinprotein, das Proteine auf der Zelloberfläche verankert. Das PIG-A-Gen verschlüsselt das Protein Acetylglucosaminyltransferase, welches für die Synthese von GPI-Ankermolekülen erforderlich ist.

### 2.1.2 Klonale Expansion GPI-defizienter Zellen

Somatische Mutationen des PIG-A-Gens werden auch in einer minimalen Fraktion der Granulozyten gesunder Menschen gefunden (Araten et al., 1999). Patienten mit hämatologischen Systemerkrankungen wie dem myelodysplastischen Syndrom (MDS) oder der aplastischen Anämie (AA) weisen häufig größere Populationen mit PIG-A-Mutationen

auf (Graham et al., 1992). Bei etwa 10 bis 36 % der Patienten mit aplastischer Anämie kann ein signifikanter GPI-defizienter Klon nachgewiesen werden (Schubert et al., 1994). Diese Beobachtungen deuten daraufhin, dass somatische Mutationen des PIG-A-Gens alleine für die klonale Expansion nicht ausreichen (Araten et al., 1999).

Betrachtet man den Mechanismus der klonalen Expansion von PIG-A-mutierten Stammzellen, so kommen hauptsächlich zwei Hypothesen in Frage. Die erste Hypothese wird mit der Überschrift „Selektion unter pathologischen Bedingungen“ titulierte (Rotoli et al., 1989; Young et al 1992; Luzzato et al., 1997; Young et al., 1997). Sie steht mit der häufigen Assoziation von PNH und aplastischer Anämie in einem Kontext und geht davon aus, dass GPI-defiziente Zellen der immunologischen Attacke besser als normale Knochenmarkstammzellen entkommen (Young et al., 2002). Hohe Ansprechraten auf immunsuppressive Therapie bei aplastischer Anämie zeigen, dass Autoimmunität gegen die hämatopoetische Stammzelle aller Wahrscheinlichkeit nach die pathophysiologische Grundlage bei aplastischer Anämie bildet. Insbesondere T-Lymphozyten scheinen als Effektor der Immunantwort eine herausragende Rolle zu spielen, da durch gegen T-Lymphozyten gerichtetes Anti-Thymozyten-Globulin eine signifikante Verbesserung des hämatologischen Befundes bei AA-Patienten erreicht wurde (Young et al., 2006). Die Abwesenheit einer großen Anzahl von Oberflächenproteinen bei der PNH könnte die Grundlage dafür bilden, dass die mutierten PNH-Klone dem Angriff durch das Immunsystem entkommen und so einen Wachstumsvorteil haben, der zu einer klonalen Expansion führt. Die zweite Hypothese geht davon aus, dass PIG-A-mutierte hämatopoetische Stammzellen zusätzliche genetische Veränderungen aufweisen, die den mutierten Zellen einen Wachstumsvorteil verschaffen, der letztlich zur klonalen Expansion führt (Lyakisheva et al., 2002; Nissen et al., 2002). Dieses Konzept lässt sich mit dem „multi-step-model“ der Tumorgenese vereinbaren und wird u.a. durch ein Fallbeispiel zweier PNH-Patienten unterstützt, die in den PIG-A-mutierten Zellen eine erworbene Mutation auf Chromosom 12 aufwiesen, welche bei vielen mesenchymalen Tumoren gefunden wird (Inoue et al., 2006). Aus diesen Beobachtungen entstand auch die Überlegung, dass es sich bei der PNH um eine gutartige Neoplasie handeln könnte (Inoue et al., 2006). Daneben wurde ein Patient mit einer selektiven Expansion eines Klon mit nur unvollständiger Defizienz GPI-verankerter Proteine beschrieben. Dieser Klon wies im Gegensatz zu den wenigen Zellen mit vollständiger Defizienz, bei denen sich neben dem alterierten PIG-A-Gen weitere Mutationen nachweisen ließen, nur eine Mutation auf (Parker 2007). Die beiden Hypothesen über die klonale

Expansion bei paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie schließen sich nicht gegenseitig aus. Es ist sogar möglich, dass beide Mechanismen zusammen agieren. Welche der Hypothesen sich als gültig erweisen wird, werden zukünftige Untersuchungen zeigen.

## **2.2 Klinische Manifestation**

Obwohl alle PNH-Patienten eine erworbene GPI-A-Mutation aufweisen, variiert der Verlauf der Erkrankung erheblich. Die klinische Manifestation ist komplex und wird vornehmlich durch drei Merkmale charakterisiert: Intravaskuläre Hämolyse, venöse Thrombose und Assoziation mit aplastischer Anämie (Dacie et al., 1972; Rosse et al., 2003; Hill et al., 2007).

Hämoglobin wird bei der intravasalen Hämolyse von GPI-defizienten Erythrozyten freigesetzt und dann von Haptoglobin gebunden und beseitigt. Ist die Kapazität des Haptoglobins überschritten, kommt es zur Präsenz freien Hämoglobins im Blut, das zunächst zu Methämoglobin oxidiert und dann durch die Nieren filtriert wird (Schubert et al., 2009). Bei stark ausgeprägtem Befund wird eine Hämoglobinurie, ein mögliches Erstsymptom, das der Erkrankung ihren Namen gibt, beobachtet. Die Urinfarbe kann bei Hämoglobinurie in Abhängigkeit von pH-Wert und Konzentration anderer Urinfarbstoffe zwischen rot und schwarz variieren (Schrezenmeier et al., 1998). Im Rahmen der Hämoglobinurie können PNH-Patienten Nierenschäden erleiden. Ungefähr 5 % der Betroffenen entwickeln nach Jahren der Erkrankung bei schweren Episoden der Hämoglobinurie ein akutes Nierenversagen mit daraus resultierender terminaler Niereninsuffizienz (Clark et al., 1981; Mooraki et al., 1998). Daneben tritt bei einem hohen Anteil der PNH-Patienten eine leichte, u.a. durch den wenn auch geringen toxischen Einfluss von Hämoglobin im proximalen Tubulus bedingte chronische Niereninsuffizienz mit erniedrigter Kreatininclearance auf (Clark et al., 1981).

Neben den Nierenschäden wird durch die intravasale Hämolyse eine Vielzahl von Symptomen hervorgerufen, die im Zusammenhang mit der Präsenz freien Hämoglobins im Plasma stehen. Freies Hämoglobin reagiert mit Stickstoffmonoxid (NO), das dabei irreversibel in das inaktive Endprodukt NO<sub>3</sub> umgewandelt wird (Olson et al., 2004). Darüber hinaus wird bei der Zerstörung der Erythrozyten das Enzym Arginase freigesetzt, was einen zusätzlichen Verbrauch von NO bewirkt. Diese Prozesse, die durch die Hämolyse ausgelöst werden, führen zu einer Reduktion der systemischen Verfügbarkeit von NO mit daraus

resultierender Dystonie der glatten Muskulatur (Rother et al., 2005). Abdomineller Schmerz ist ein häufiges Symptom bei PNH-Patienten und beruht, sofern dieser nicht ein Hinweis auf eine venöse Thrombose ist, auf einem Mangel der intestinalen Hohlgänge an NO und damit einhergehender Dystonie (Moyo et al., 2004). Ösophageale Spasmen und Dysphagie sind ebenfalls eng mit der hämolytischen Aktivität bei PNH assoziiert und gelten als weitere Manifestationsform der Dystonie glatter Muskulatur. Die erektile Dysfunktion ist ein häufiges Problem bei männlichen PNH-Patienten. Sie tritt sowohl bei hämolytischen Krisen, als auch in Phasen chronischer Hämolyse auf (Moyo et al., 2004). PDE5-Hemmer werden zur Therapie dieser Symptome eingesetzt, zeigen jedoch nur bei Abwesenheit massiver Hämoglobinurie, also in Phasen mit ausreichender Verfügbarkeit von NO eine Wirkung (Rother et al., 2005). Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass die Hämolyse und der damit einhergehende Verbrauch von Stickstoffmonoxid eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der erektilen Impotenz bei PNH spielen.

Venöse Thrombosen bei PNH-Patienten sind sehr gefürchtet, da sie die häufigste Todesursache bei PNH darstellen (Rosse et al., 2004; Socié et al., 1996). Die Thrombosen treten häufig im Bereich der Leber-, Mesenterial- oder Cerebralvenen auf und nehmen gehäuft einen schweren Verlauf. Historische Untersuchungen zeigen, dass etwa 40 % der PNH-Patienten in Abhängigkeit von der PNH-Klonegröße zu irgendeinem Zeitpunkt der Erkrankung eine Thrombose erleiden und etwa ein Drittel dieser an den Folgen einer solchen verstirbt (Hillmen et al., 1995; Socie et al., 1996). Besonders problematisch sind Thrombosen bei schwangeren PNH-Patientinnen, so dass eine Schwangerschaft u.a. aus diesem Grund sowohl für die Mutter als auch für das Kind hohe Risiken birgt (Fieni et al., 2006). Eine Vielzahl pathogener Mechanismen wird für die Thrombophilie bei der PNH verantwortlich gemacht. Forscher fanden auch bei diesem Symptom einen direkten Zusammenhang zur Hämolyse mit erhöhtem Verbrauch von NO. Es konnte nachgewiesen werden, dass Stickstoffmonoxid bei gesunden Menschen dazu beiträgt, Thrombozytenaggregation und -adhäsion zu verhindern (Catani et al., 1998). Der Mangel an Stickstoffmonoxid bei PNH hingegen führt zu einer erhöhten Thrombosebereitschaft (Rother et al., 2005). Zudem wird die erhöhte Thromboseneigung bei PNH auf eine Freisetzung prokoagulatorischer Mikrovesikel aus Komplementfaktoren oder aus aktivierten Thrombozyten (Wiedmer et al., 1993; Gralnick et al., 1995; Hugel et al., 1999) und auf eine defekte fibrinolytische Aktivität aufgrund eines Verlustes des Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptors von Monozyten oder Neutrophilen (Plesner et al., 1997; Ninomiya et al., 1997) zurückgeführt. Andere Forscher

stellten die Vermutung auf, dass Thrombosen bei PNH-Patienten mit einer erhöhten Expression des Gewebefaktors (tissue factor [TF]) einhergehen (Liebmann et al., 2003). Patienten mit einem GPI-defizienten Granulozytenanteil von über 50 % zeigen gehäuft Thrombosen, so dass man davon ausgeht, dass die Größe des GPI-defizienten Granulozytenklons einen direkten Einfluss auf die Thrombosehäufigkeit nimmt (Hall et al., 2003).

Das Auftreten PNH-typischer Veränderungen steht im Zusammenhang mit anderen hämatologischen Systemerkrankungen. Eine Verbindung zwischen der Knochenmarkhypoplasie und der PNH wurde erstmals von Dacie und Lewis beschrieben (Dacie et al., 1961). Besonders erwähnenswert ist in diesem Kontext die aplastische Anämie (Schubert et al., 1994). Etwa die Hälfte der Patienten mit aplastischer Anämie weist in größerer Anzahl Zellen mit den typischen Charakteristika der PNH auf (Schrezenmeier et al., 1995; Nissen et al., 1999; Mukhina et al., 2001). Zudem konnte gezeigt werden, dass ein beachtlicher Teil von Patienten mit aplastischer Anämie, die immunsuppressiv mit Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) behandelt wurden, eine PNH entwickelt (de Planque et al., 1987; Tichelli et al., 1994; Nissen et al., 1999). Darüber hinaus wird bei einigen PNH-Patienten ein Übergang in eine aplastische Verlaufsform, das so genannte PNH/Aplasie-Syndrom, beobachtet (Lewis et al., 1967). Bis zu 10 % der Patienten sterben an den Folgen einer mit der PNH assoziierten aplastischen Anämie (Hill et al., 2007). Daneben wird in der Literatur das gemeinsame Auftreten eines myelodysplastischen Syndroms (MDS) und einer PNH beschrieben. PNH-Klone werden bei etwa 10-23 % der MDS-Patienten beobachtet (Iwanga et al., 1998; Dunn et al., 1999). Eine weitere, jedoch seltene Komplikation bei der PNH ist die akute myeloische Leukämie (AML; Devine et al., 1987; Harris et al., 1999). Die Inzidenz einer AML ist bei PNH-Patienten ähnlich hoch wie die bei Patienten mit aplastischer Anämie und beträgt etwa 5 % (Hill et al., 2007). Von den bisher genannten Komplikationen, die in einem direkten Zusammenhang mit der Erkrankung stehen, unterscheidet man so genannte „behandlungsassoziierte Komplikationen“, wie Hepatitis oder Hämosiderose, die durch Bluttransfusionen hervorgerufen werden (Socié et al., 1996).

Der klinische Verlauf der PNH ist äußerst variabel, jedoch in der Regel chronisch (Späth-Schwalbe et al., 1995). Anhand einer Klassifikation, die die verschiedenen klinischen Manifestationen und Erkrankungsgeschichten berücksichtigt, kann die PNH in drei Subkategorien unterteilt werden. Zu diesen gehören die so genannte klassische PNH, die PNH

auf dem Boden einer anderen spezifischen Erkrankung des Knochenmarks und die subklinische PNH (Parker et al., 2005). Bei Patienten mit klassischer PNH lässt sich der klinische und laborchemische Nachweis einer intravasalen Hämolyse erbringen. Andere abgrenzbare Anomalien des Knochenmarks werden bei dieser Verlaufsform nicht beobachtet. An einer PNH auf dem Boden einer anderen spezifischen Knochenmarkerkrankung erkrankte Patienten zeigen klinisch bzw. laborchemisch eine Hämolyse und weisen begleitend Knochenmarkanomalien wie etwa eine AA oder ein MDS auf. In Abgrenzung zu den bisher beschriebenen Verlaufsformen der PNH lassen sich bei der subklinischen PNH, trotz des durchflusszytometrischen Nachweises kleinerer Populationen GPI-defizienter Zellen, keine klinischen oder laborchemischen Anzeichen einer Hämolyse feststellen. Zudem besteht hier ebenfalls eine Assoziation zu anderen Erkrankungen des Knochenmarks, insbesondere zur aplastischen Anämie und zum myelodysplastischen Syndrom.

## **2.3 Diagnostik**

Der erste diagnostische Test, mit dessen Hilfe man die PNH von anderen hämolytischen Anämien unterscheiden konnte, ist der so genannte „Ham Test“ (Rosse et al., 1991; Moyo et al., 2004). Er wurde 1937 von dem gleichnamigen Forscher T.H. Ham eingeführt und basiert auf einer erhöhten Sensitivität der PNH-Erythrozyten gegenüber Komplement (s.o). Wegen einer geringen Sensitivität und Spezifität hat er heute nur noch historische Bedeutung (Parker et al., 2002). Ähnliches gilt für den Zucker-Wasser-Test (Sucrose Lysis Test; Hartmann et al., 1965).

Die durchflusszytometrische Analyse ist die sensitivste und gleichzeitig informativste Untersuchung zur Diagnostik einer PNH (Schubert et al., 1991; Hall et al., 1996; Richards et al., 1996). Bei der initialen Bestimmung des PNH-Klons wird die Quantifizierung von mindestens zwei GPI-verankerten Proteinen empfohlen, um die Möglichkeit einer isolierten Defizienz eines einzelnen GPI-verankerten Proteins auszuschließen (Yamashina et al., 1990). Bei Patienten mit einem stabilen Erkrankungsverlauf ist die jährliche durchflusszytometrische Analyse ausreichend. Eine Änderung der klinischen Parameter erfordert eine sofortige Reevaluation des letzten Befunde (Parker et al., 2005). Auch bei einer Verbesserung des klinischen Bildes sollte eine sofortige Diagnostik erfolgen, da es gelegentlich zu einer Verminderung oder zu einem Verschwinden der GPI-defizienten Zellen kommen kann



(Hillmen et al., 1995). Ein regelmäßiges Monitoring wird auch empfohlen, weil die prophylaktische Antikoagulation von der Größe des GPI-defizienten Klons abhängig gemacht wird (Hall et al., 2003; Nishimura et al., 2004). Die durchflusszytometrische Analyse liefert nicht nur Informationen über das Vorhandensein einer GPI-defizienten Population, sondern ermöglicht es auch, Aussagen über den Grad der Defizienz zu treffen. Der Grad der Defizienz ist für die Nomenklatur von PNH-Erythrozyten verantwortlich. Erythrozyten mit einer vollständigen Defizienz GPI-verankerter Proteine werden Typ-III-Zellen, diejenigen mit einer nur unvollständigen Defizienz werden Typ-II-Zellen, und die mit normaler Expression GPI-verankerter Proteine werden Typ-I-Zellen genannt (Holguin et al., 1989). Transfusionen mit Erythrozytenkonzentraten erhöhen den Anteil der Zellen mit normaler Expression von CD55 und CD59. Um genaue Informationen über den Prozentsatz an GPI-defizienten Erythrozyten zu erhalten, sollte die durchflusszytometrische Analyse daher möglichst in einem Zeitraum ohne Transfusionen erfolgen (Parker et al., 2005). Daneben ist die Analyse von GPI-defizienten Granulozyten besonders sinnvoll, da diese im Gegensatz zu den GPI-defizienten Erythrozyten nicht von den Bluttransfusionen beeinflusst werden (Wendell et al., 2004). Zudem ist ihre Lebensdauer bei der PNH nicht verkürzt, so dass auch aus diesem Grund der Anteil der GPI-defizienten Granulozyten die PNH-Klongröße widerspiegelt (Piedras et al., 2000).

Eine weitere Möglichkeit zur Diagnose und Verlaufskontrolle der PNH ist die so genannte „FLAER-Untersuchung“ (fluorescently labeled aerolysin). Diese ist für die Analyse GPI-defizienter Proteine auf Leukozyten, aber nicht auf Erythrozyten sinnvoll (Brodsky et al., 1999; Brodsky et al., 2000). Der Nachweis defizienter GPI-verankerter Proteine auf CD34-positiven Zellen im Knochenmark ist aussagekräftig, wird jedoch für die Standarddiagnostik der PNH nicht benötigt. Die morphologische Analyse des Knochenmarkes sollte durchgeführt werden, da die PNH häufig mit anderen Funktionsstörungen des Knochenmarks und gelegentlich auch mit klonalen Myelopathien vergesellschaftet ist (Araten et al., 2001; Meletis et al., 2002). Die zytogenetische Diagnostik wird empfohlen, weil damit karyotypische Anomalien, die auf einer anderen zugrunde liegenden Erkrankung beruhen könnten, erkannt werden. Die Identifizierung der PIG-A-Mutation kann die Diagnose einer PNH bestätigen, wird jedoch nur zu Forschungszwecken durchgeführt.

## 2.4 Therapiestrategien

### 2.4.1 Konventionelle Therapiestrategien

Die konventionelle Therapie der PNH ist vorwiegend symptomatisch und besteht aus der Prävention und Behandlung von Komplikationen.

Bluttransfusionen sind für die supportive Therapie von PNH-Patienten essentiell. Durch die hierdurch verursachte Zunahme des Anteils an Zellen ohne GPI-Anker-Defizienz kann eine erhöhte Resistenz gegenüber den Komplementfaktoren mit damit einhergehender Reduktion der intravasalen Hämolyse erreicht werden. Der Rückgang der Hämolyse und der Anstieg des Hämoglobinwertes führen zu einer Verbesserung der Lebensqualität. Eine iatrogene Eisenüberladung muss wegen des Eisenverlustes durch die Hämoglobinurie in der Regel nicht befürchtet werden (Rosse et al., 1982). Kortikosteroide werden sowohl zur Therapie der chronischen als auch bei der Exazerbation der akuten Hämolyse eingesetzt (Rosse et al., 1982). Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass nur ein Teil der Patienten von Steroiden profitiert (Issaragrisil et al., 1987). Neben der relativ geringen Ansprechrate auf die Steroidmedikation wird das langfristige Auftreten substanzspezifischer Nebenwirkungen als Nachteil dieser Therapieform angesehen. Obwohl viele PNH-Patienten transfusionsabhängig sind, führt die chronische Hämoglobinurie häufig zu massivem Eisenmangel, so dass eine orale oder parenterale Substitution erforderlich werden kann (Rosse 1982; Hartmann et al., 1966). Die Verabreichung von Folsäure wird bei der Hämolyse und einer damit verbundenen reaktiven Erhöhung der Produktion roter Blutzellen empfohlen (Hill et al., 2007). Welche therapeutische Rolle die Splenektomie bei PNH einnehmen sollte, ist umstritten. Vielfach geäußerte Bedenken über eine mangelnde Effektivität und hohe Risiken dieses Eingriffs haben dazu geführt, dass diese Maßnahme von vielen Experten abgelehnt wird. Ob und wenn ja in welcher Form eine Antikoagulation bei PNH-Patienten durchgeführt werden soll, ist ebenfalls Gegenstand der Diskussion. Von einigen Forschern wird zur Primärprophylaxe einer Thrombose eine Marcumarisierung bei Patienten mit einem Anteil an GPI-defizienten Granulozyten von über 50 % empfohlen. (Hall et al., 2003). Eine lebenslange Antikoagulation wird daneben bei Patienten, die bereits ein thromboembolisches Ereignis durchgemacht haben, durchgeführt. Thrombolytische oder radiologische Interventionen sollten bei einem

akuten Budd-Chiari Syndrom in Erwägung gezogen werden (McMullin et al., 1994; Griffith et al., 1996).

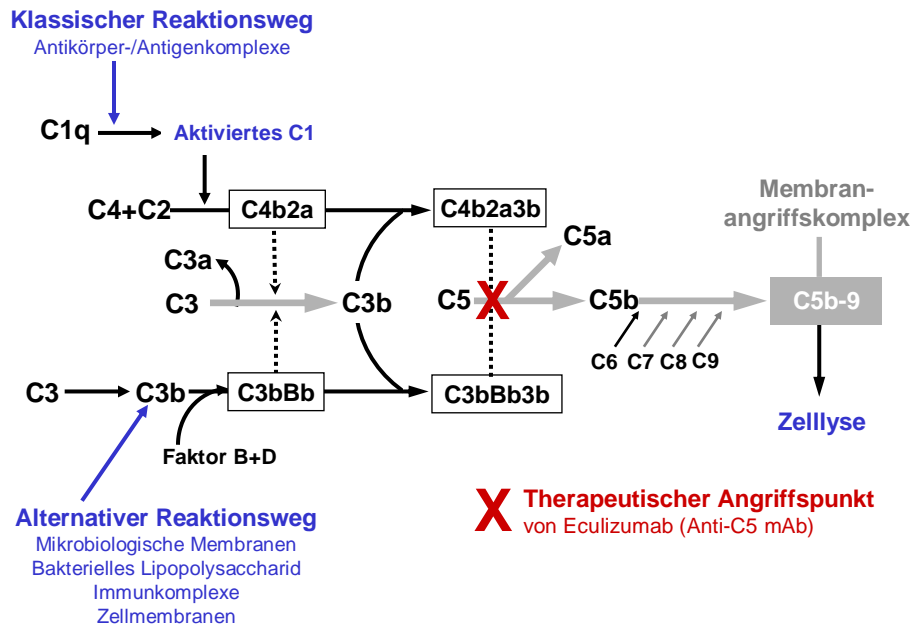
Die einzige kurative Therapiemöglichkeit ist die allogene Stammzelltransplantation (SZT) (Raiola et al., 2000; Lee et al., 2003). Diese birgt aufgrund einer Mortalitätsrate von ca. 30-50 % innerhalb von 5 Jahren nach allogener SZT, die für eine nicht maligne Grunderkrankung wie der PNH als unzumutbar hoch angesehen werden muss, ein beachtliches Risiko für den Patienten (Bemba et al., 1999; Saso et al., 1999). In den meisten Fällen wird die allogene Stammzelltransplantation nur bei Patienten mit Komplikationen wie ausgeprägter Knochenmarkinsuffizienz empfohlen. Das Konditionierungsprotokoll wird üblicherweise analog zu dem von Patienten mit aplastischer Anämie entworfen und sieht eine kombinierte Therapie aus Busulfan, Fludarabin und Antithymozytenglobulin (ATG) oder ein dosisreduziertes Regime bestehend aus Cyclophosphamid und ATG vor (Lee et al., 2003).

#### **2.4.2 Neue Therapiestrategien**

Ein neuer therapeutischer Ansatz bei PNH könnte der künstliche Ersatz von CD59 sein. Rother et al. wiesen nach, dass eine rekombinante transmembrane Form von CD59 die Zellen vor der Hämolyse schützt (Rother et al., 1994). Es ist jedoch sehr aufwändig, GPI-assoziiertes CD59 von der Zellmembran zu extrahieren, da es extrem fest gebunden ist. Zudem weist CD59 nach Ablösung von der Zellmembran keine guten Bindungseigenschaften auf. In der Literatur wird daneben von Untersuchungen mit einem künstlichen Glykolipidanker (Prodaptin) von CD59 berichtet (Sah et al. 2004; Hill et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass Prodaptin-CD59 PNH-Zellen in vitro und in vivo ummantelt und so die Widerstandsfähigkeit gegenüber Komplement erhöht. Diese therapeutische Option ist sehr nebenwirkungsarm, weil die Komplementfaktoren nicht gehemmt werden und damit kein erhöhtes Risiko von Infektionen mit kapseltragenden Bakterien entsteht. Daneben erscheint ein gentherapeutischer Ansatz besonders attraktiv. Die Einführung des PIG-A-Gens in die hämatopoetische PNH-Stammzelle ist jedoch keineswegs trivial und könnte die „korrigierte“ Zelle zum Ziel des postulierten aplastischen Prozesses werden lassen, welcher als Ursache für die Proliferation des PNH-Klons in Frage kommt (Rosse et al., 2004).

Eine vielversprechende therapeutische Alternative ist die Hemmung des terminalen Komplementsystems durch Eculizumab (Kaplan et al., 2002). Der Antikörper bindet den

Komplementfaktor C5 und verhindert dessen Spaltung in die Komponenten C5a und C5b. Durch die Unterbrechung der Komplementkaskade bleibt die Generierung des Membranangriffskomplexes C5b-C9 aus, so dass letztendlich die Lyse der GPI-defizienten Zellen verhindert wird. Bei der Blockade der Komplementkaskade auf der Höhe von C5 werden die C3b vermittelte Opsonierung und die damit einhergehenden immunprotektiven und immunregulatorischen Funktionen des Komplementsystems aufrechterhalten (Matis et al., 1995; Dmytrijuk et al., 2008). Dennoch ist das Risiko einer Infektion mit den kapseltragenden Mikroorganismen *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis* erhöht. Aus diesem Grund wird eine Impfung gegen *Neisseria meningitidis* vor Beginn der Antikörpertherapie empfohlen. Diese neue Therapiestrategie brachte den über 180 teilnehmenden PNH-Patienten der beiden Phase-III-Studien TRIUMPH (Transfusion reduction efficacy and safety clinical investigation, randomized, multi-center, double-blind, placebo-controlled, using Eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; Hillmen et al., 2006) und SHEPHERD (Safety in hemolytic PNH patients treated with Eculizumab: A multi-center open-label research design study; Brodsky et al., 2008) einen großen Nutzen. Durch den Einsatz von Eculizumab wurden die intravasale Hämolyse und die Hämoglobinurie fast vollständig unterbunden, so dass bei ca. 50 % der mit Verum therapierten PNH-Patienten eine Stabilisierung der Hämoglobinwerte und eine Transfusionsunabhängigkeit erreicht werden konnten (Hillmen et al., 2006; Schubert et al., 2008; Brodsky et al., 2008). Daneben können durch die Gabe des anti-C5-Antikörpers Muskeldystonie, thromboembolisches Risiko, Zeichen einer Niereninsuffizienz und eines pulmonalen Hypertonus signifikant reduziert werden (Hill et al., 2005 b; Hillmen et al., 2007; Hill et al., 2010; Hillmen et al., 2010). Der Antikörper ist seit März 2007 in den USA und seit Juni 2007 in der EU zugelassen. Die Markteinführung in der EU wurde im Juli 2007 durch die Zulassung seitens der Europäischen Zulassungsbehörde ermöglicht.



**Abb. 2. Therapeutischer Angriffspunkt von Eculizumab.** Der monoklonale Antikörper Eculizumab bindet den Komplementfaktor C5 und verhindert dessen Spaltung, so dass der Membranangriffskomplex nicht gebildet und die Komplement-vermittelte Zelllyse unterbunden wird.

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Material

**Tab. 1. Reagenzien**

| Reagenzien               | Hersteller            |
|--------------------------|-----------------------|
| Lysing solution          | Becton Dickinson      |
| Aqua B ecotainer         | Braun                 |
| FACS solution            | Becton Dickinson      |
| Cell wash                | Becton Dickinson      |
| PBS Dulbecco´s Phosphate | PAA Laboratories GmbH |
| Sheath fluid             | Dako Cytomation       |
| FACS clean               | Becton Dickinson      |

**Tab. 2. Verbrauchsmaterialien**

| Verbrauchsmaterialien                            | Hersteller             |
|--|------------------------|
| FACS Röhrchen 5 ml                               | Becton Dickinson       |
| Pipettenspitzen (5µl, 10µl, 20µl, 100µl, 1000µl) | Eppendorf und Sarstedt |
| Eppendorf Combitips                              | Eppendorf              |
| EDTA Monovette                                   | Sarstedt               |

**Tab. 3. Geräte**

| Geräte  | Hersteller       |
|---|------------------|
| Durchflusszytometer FACS Calibur                    | Becton Dickinson |
| Lyse-wash Assistent                                 | Becton Dickinson |
| Eppendor fzentrifuge Minifuge                       | Eppendorf        |
| Kühlschrank 4°C                                     | Bosch            |
| Vortexer Reax 2000                                  | Heidolph         |
| Eppendor fzentrifuge BHG Hermle 380                 | Eppendorf        |
| Eppendorf Pipetten (5µl, 10µl, 20µl, 100µl, 1000µl) | Eppendorf        |
| Multipipette 4780                                   | Eppendorf        |

**Tab. 4. Antikörper**

| <b>Antikörper</b>     | <b>Hersteller</b>          |
|-----------------------|----------------------------|
| IgG-PE                | Becton Dickinson           |
| CD15-FITC             | Dako Cytomation            |
| CD55-PE               | Becton Dickinson           |
| CD58-PE               | Beckman Coulter Immunotech |
| CD59-PE               | Becton Dickinson           |
| Glykophorin A         | Dako Cytomation            |
| ReticCount Tm Reagenz | Becton Dickinson           |

### 3.2 Studienpatienten

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Studienpatienten handelt es sich um vier Frauen und drei Männer mit diagnostizierter paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie (PNH). Die Patienten wurden während des Beobachtungszeitraumes von der Abteilung für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums des Saarlandes betreut. Zur Vereinfachung der Darstellung wird in den folgenden Abschnitten dieser Arbeit keine sprachliche Kennzeichnung von männlichen und weiblichen Patienten getroffen.

#### Patient 1:

Bei dem aus dem arabischen Raum stammenden 1960 geborenen Patienten wurde im Januar 2004 die Erstdiagnose (ED) einer PNH mit primär hämolytischer Verlaufsform gestellt. Erstsymptome der Erkrankung waren Dyspnoe und Sklerenikterus. Bis zur Einleitung der Eculizumabtherapie wurden dem Patienten aufgrund der Anämie in unregelmäßigen Abständen von wenigen Monaten Erythrozytenkonzentrate transfundiert. Neben der PNH lagen bei Studienbeginn keine weiteren Erkrankungen vor.

Patientin 2 :

Bereits im Januar 2002 wurde bei der 1982 geborenen Studienteilnehmerin erstmals eine Hämoglobinurie beobachtet, woraufhin eine Therapie mit Steroiden eingeleitet wurde, ohne dass es unter dieser Medikation zu einer Besserung der Symptomatik kam. Im Rahmen eines stationären Krankenhausaufenthaltes aufgrund multipler Lungenembolien wurde 2004 die Erstdiagnose einer PNH mit primär hämolytischer Verlaufsform gestellt. Daraufhin erhielt die Patientin eine dauerhafte orale Antikoagulation mit Marcumar und aufgrund eines Eisenmangels Eisenpräparate. Eine Hämoglobinurie tritt seit Erstdiagnose der PNH etwa vier Mal pro Monat auf. Bis zum Studieneinschluss wurden der Patientin zwei Erythrozytenkonzentrate transfundiert.

Patient 3:

Bei dem 1940 geborenen Studienteilnehmer wurde 1974 die Erstdiagnose einer PNH mit primär hämolytischer Verlaufsform gestellt. Durch die seit 1997 durchgeführte Steroidtherapie wurde ein Rückgang der Transfusionshäufigkeit erreicht. Im Rahmen grippaler Infekte kam es seitdem weiterhin zur Hämolyse, die auch mit erhöhten Steroiddosen nicht zu kupieren war, so dass der Patient in ein- bis zwei monatlichen Abständen Transfusionen mit Erythrozytenkonzentraten erhielt. Bei dem Patienten besteht zudem eine chronische Niereninsuffizienz im Stadium der kompensierten Retention bei Verdacht auf eine hämoglobinurische Nephropathie. Im Jahr 2000 kam es zu einem subakuten embolischen Infarkt der A. cerebri media links. Eine fluktuierende neurologische Symptomatik besteht seit dem Beginn des Jahres 2001. Im darauf folgenden Jahr wurde ein Mediateilinfarkt rechts diagnostiziert. Wegen rezidivierender transitorischer ischämischer Attacken (TIAs) wurde eine Antikoagulation mit Marcumar eingeleitet.

Patientin 4:

Seit 1997 ist bei der 1969 geborenen Patientin eine hämolytische Anämie bekannt. Bei Zunahme der Hämolyseschübe wurde im Jahr 2002 die Erstdiagnose einer paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie gestellt. Im Rahmen der Hämolyseschübe traten nachts tiefrötliche Verfärbungen des Urins auf, die mit Bauchschmerzen einhergingen. Neben einer Therapie mit Folsäure und niedrig dosierten Steroiden erhielt die Patientin bis zur Aufnahme in die Therapiestudie vereinzelt Bluttransfusionen.



Patientin 5:

Bei der 1954 geborenen Patientin wurde 1979 die Diagnose einer PNH mit aplastischer Anämie gestellt. Aufgrund dieser Erkrankung wurde 2001 eine Steroidtherapie eingeleitet. Bei Zunahme der Knochenmarkinsuffizienz kam es im Jahr 2005 zu einer Verschlechterung der Anämie und zu einer Thrombozytopenie, welche sich insbesondere durch Gingivablutungen bemerkbar machte. Die Patientin erhielt in den vergangenen Jahren regelmäßig Erythrozytenkonzentrate.

Patient 6:

Die Erstdiagnose einer PNH mit primär hämolytischer Verlaufsform wurde bei dem 1950 geborenen Patienten im Jahre 2001 gestellt. Zu diesem Zeitpunkt war der Patient noch asymptomatisch. Erst zwei Jahre später (2003) wurde der Patient durch einen Sklerenikterus, ein Fatigue Syndrom und eine Gelbfärbung des Urins symptomatisch, woraufhin der Patient erstmals Erythrozytenkonzentrate erhielt. Es wurden daraufhin eine niedrig dosierte Steroidtherapie und eine Marcumartherapie eingeleitet.

Patientin 7:

Bei der 1958 geborenen Patientin wurde 1995 die Diagnose einer aplastischen Anämie gestellt. Eine immunsuppressive Therapie führte zu einer kompletten Remission der Erkrankung. 1998 fiel eine zunehmende Hämolyseaktivität auf, die sich klinisch durch eine Hämoglobinurie, einen Sklerenikterus und eine Anämiesymptomatik äußerte, woraufhin die Erstdiagnose einer PNH gestellt wurde. Seit 1999 ist die Patientin regelmäßig transfusionsbedürftig. Im Jahr 2000 wurde die Patientin wegen einer unklaren abdominalen Schmerzsymptomatik stationär aufgenommen. Rückblickend wurde aufgrund der typischen Symptomatik bei bekannter Grunderkrankung der V.a. eine Mesenterialvenenthrombose gestellt.

### **3.3 Studienablauf**

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten sieben PNH-Patienten wurden in zwei verschiedene Phase-III-Therapiestudien rekrutiert, die sich hinsichtlich der Therapie mit dem Anti-C5-Antikörper Eculizumab nicht unterschieden.

Die oben genannten Patienten 4, 6 und 7 wurden in die TRIUMPH-Studie eingebracht. Hierbei handelt es sich um eine randomisierte, Placebo-kontrollierte Multi-Center-Doppelblindstudie, an der in Nordamerika, Europa und Australien etwa 75 Patienten mit transfusionsabhängiger hämolytischer PNH teilnahmen. Prüfsubstanz der Therapiestudie war der Anti-C5-Antikörper Eculizumab. Primäre Zielgröße war die Bewertung der Sicherheit und Effektivität von Eculizumab bei Patienten mit einer transfusionsabhängigen, hämolytischen, paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie. Die Patienten 6 und 7 erhielten Verum. Patient 4 erhielt zunächst das Placebomedikament, brach diese Therapie nach einigen Sitzungen aufgrund mangelnder Wirksamkeit jedoch ab und erhielt seit Beginn der Extensionsphase das Verumpräparat, so dass der Einschluss in die vorliegende Arbeit ermöglicht wurde. Auch die anderen beiden Patienten nahmen an der Extensionsphase der Studie teil. In der im Ergebnisteil angegebenen Woche 0 wurde der Antikörper erstmals verabreicht.

Die Patienten 1, 2, 3 und 5 wurden in die Folgestudie, die SHEPHERD-Studie eingebracht. Insgesamt nahmen etwa 85 Patienten mit transfusionsabhängiger, hämolytischer PNH an dieser nicht Placebo-kontrollierten Multi-Center Studie teil. Die Patienten wurden in Zentren in Nordamerika, Europa und Australien mit Eculizumab behandelt. Primäre Zielgröße war die Bewertung der Sicherheit von Eculizumab bei Patienten mit einer transfusionsabhängigen paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie. Um die Antikörpertherapie nach Studienende trotz der zu diesem Zeitpunkt noch nicht erfolgten Zulassung weiterhin zu erhalten, nahmen alle Patienten an der Extensionsphase teil.

Alle Studienteilnehmer erhielten Eculizumab erstmalig und in dem für diese Arbeit relevanten Zeitraum nach dem gleichen Therapieschema. Die Applikation des Antikörpers erfolgte intravenös über 30 Minuten. In den ersten vier Behandlungswochen erhielten die Patienten 600 mg Eculizumab ein Mal wöchentlich. In der darauf folgenden Woche wurden 900 mg Eculizumab verabreicht. Während der sich anschließenden Erhaltungsperiode wurde Eculizumab in der gleichen Dosierung 14-tägig appliziert. Alle Patienten erhielten während des Beobachtungszeitraums dieser Arbeit, der sich über 44 Wochen erstreckt, zwei Wochen vor Therapieeinleitung beginnt und 42 Wochen nach Beginn der Therapie endet, 24 Antikörpergaben. Die Daten über die Transfusionshäufigkeit vor Einleitung der Therapie mit Eculizumab wurden teilweise retrospektiv erhoben und beziehen sich auf ein vollständiges Kalenderjahr vor und nach Therapieeinleitung. Woche 0 bezeichnet den Zeitpunkt der erstmaligen Gabe des Antikörpers.

### 3.4 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Ein- und Ausschlusskriterien zur Teilnahme an beiden Therapiestudien werden zusammenfassend dargestellt. Die ausführlichen Kriterien sind in den jeweiligen Studienprotokollen zu finden.

#### **Einschlusskriterien der TRIUMPH-Studie:**

- Alter > 18 Jahre
- vier „qualifizierende“ Bluttransfusionen in den letzten 12 Monaten
- durchflusszytometrischer Nachweis eines GPI-defizienten Blutzellklons von  $\geq 10\%$
- Thrombozytenwerte von  $\geq 100.000/\mu\text{l}$
- 1,5-fach über der Norm liegende LDH-Werte
- Kontrazeption bei weiblichen Patienten
- schriftliche Einverständniserklärung
- Einnahme/Gabe der folgenden Medikamente: Erythropoetin, Immunsuppressiva, Steroide, Kumarine, Eisenzusätze, Folsäure und niedermolekulare Heparine
- gut kontrollierter Diabetes mellitus (Blut Glucose  $\leq 300\text{mg/dl}$  oder HbA1c  $\leq 9\%$ )
- „qualifizierende“ Bluttransfusion in der Screeningphase

#### **Ausschlusskriterien der TRIUMPH-Studie:**

- regelmäßige Bluttransfusionen bei Hb-Werten von  $>10\text{ g/dl}$
- absolute Neutrophilenzahl  $\leq 1000/\mu\text{l}$
- Alkohol- oder Drogenabusus in den letzten zwei Jahren
- $\text{GFR} < 30\text{ cc/min/1,73 m}^2$  (Cockcroft Gault Formel)
- Z.n. Leberversagen
- Z.n. maligner Erkrankung
- Vorhandensein oder Verdacht auf bakterielle Infektionen
- bekannte oder hereditäre Defekte des Komplementsystems
- Teilnahme an jeglicher Therapiestudie innerhalb der letzten 30 Tage
- schwangere bzw. stillende Patientinnen
- vorausgegangene Meningokokkeninfektion
- Z.n. Knochenmarktransplantation
- Z.n. allergischer Reaktionen auf murine Proteine

- frühere Eculizumabtherapie
- jede Bedingung, unter der nach Meinung des Prüfers das Risiko für die Patienten bei Studienteilnahme erhöht oder unter der das Ergebnis der Studie verfälscht werden könnte

**Einschlusskriterien der SHEPHERD-Studie:**

- Alter von > 18 Jahren
- Erstdiagnose einer PNH vor mindestens 6 Monaten
- durchflusszytometrischer Nachweis eines GPI-defizienten Blutzellklons von  $\geq 10\%$
- Kontrazeption bei weiblichen Patienten
- mindestens eine Bluttransfusion in den letzten zwei Jahren
- nicht mehr als drei Bluttransfusionen in den letzten 12 Monaten
- 1,5-fach über der Norm liegende LDH-Werte
- schriftliche Einverständniserklärung

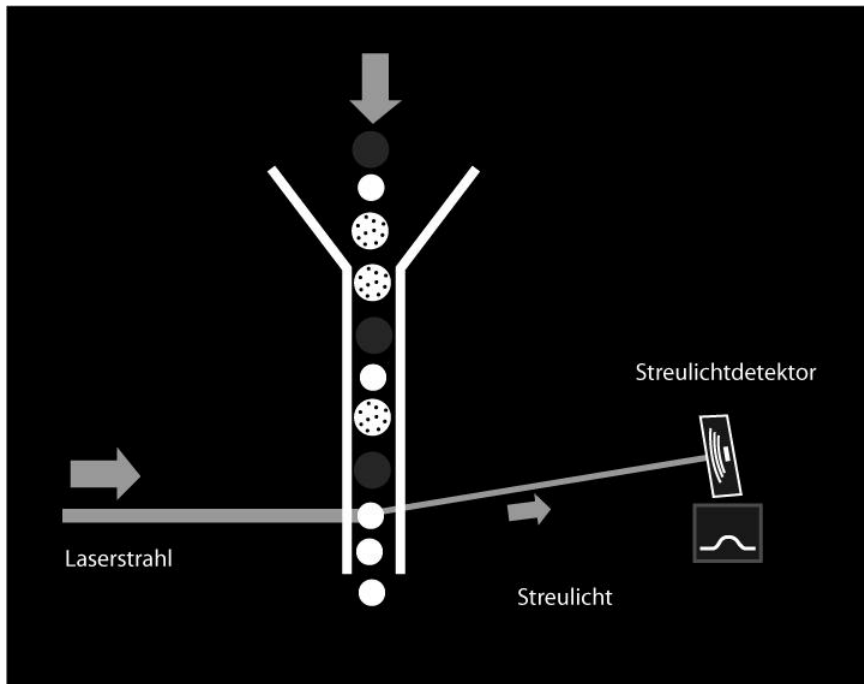
**Ausschlusskriterien der SHEPHERD-Studie:**

- Thrombozytenwerte von  $< 30.000/\mu\text{l}$
- absolute Neutrophilenzahl  $\leq 500/\mu\text{l}$
- bakterielle Infektionen
- hereditäre Komplementdefizienz
- Z.n. Knochenmarktransplantation
- Teilnahme in den vergangenen 30 Tagen vor Beginn der Screeningphase an einer Therapiestudie
- vorausgegangene Meningokokkeninfektion
- kein Nachweis einer Impfung gegen *N. meningitidis*
- schwangere oder stillende Patientinnen
- jede Bedingung, unter der nach Meinung des Prüfers das Risiko für die Patienten bei Studienteilnahme erhöht oder unter der das Ergebnis der Studie verfälscht werden könnte

### 3.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Charakterisierung von Zellen. Zur Analyse der Zellen werden bestimmte Oberflächenantigene ([CD] cluster of differentiation) mit markierten Antikörpern gekoppelt. Durch verschiedene Kombinationen von Antikörpern gelingt eine genaue Typisierung der Zellen.

Im Durchflusszytometer (hier: FACS Calibur) werden die antikörpermarkierten Zellen in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Laserstrahl geleitet, der den an den Antikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoff anregt. Die Intensität des emitierten Lichts ist ein Maß für die Expressionsdichte des durch den jeweiligen Antikörper gebundenen Antigens auf der untersuchten Zelle. Das Ergebnis der Lichtstreuung durch die einzelnen Zellen wird über ein Softwareprogramm (hier: CellQuestPro Software) ausgewertet und als Dot Blot (Frequenz der Zellen) bzw. Histogramm (mittlere Expressionsdichte pro Zelle) dargestellt. Die gerade Streuung (forward scatter, FSC; Absorption durch die Zelle) ist ein Maß für die Zellgröße, die seitliche Streuung (side scatter, SSC; Beugung) für die Dichte und Granularität der Zellen. So können die gesuchten Zellen anhand ihrer Zellgröße und Granularität ermittelt werden. Um die zu analysierende Zellpopulation wird dann ein Gate gelegt, so dass die für die Untersuchung nicht relevanten Zellen von der Auswertung ausgenommen werden. Die so erfassten Zellen können dann bezüglich der Expression der gefärbten Oberflächenantigene weiter untersucht werden.



**Abb. 3. Prinzip der Durchflusszytometrie.** Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom einzeln durch einen Laserstrahl geführt. Dabei entsteht Streulicht, das über einen Detektor aufgefangen wird und Informationen über Größe und Granularität der Zelle liefert. Weitere Informationen können durch Antikörper, die gegen bestimmte Oberflächenproteine gerichtet sind, gewonnen werden. Die Antikörper sind mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert.

### 3.5.1 Standard Vollblut-Oberflächenfärbung

Die Färbungen wurden zu den Untersuchungszeitpunkten bei dem jeweiligen Studienpatienten und einer gesunden Kontrollperson durchgeführt. Alle Arbeitsschritte fanden bei Raumtemperatur statt.

#### Granulozytenfärbung:

Die PNH-Diagnostik für Granulozyten besteht aus zwei Ansätzen. Die Antikörper wurden nach folgendem Schema pipettiert:

**Tab. 5. Pipettierschema zur Granulozytenfärbung**

| Ansatz | Antikörper | Menge                                    |
|--------|------------|--|
| 1      | CD15-FITC  | 5 µl einer mit PBS 1:2 verdünnten Lösung |
|        | CD55-PE    | 20 µl                                    |
| 2      | CD15-FITC  | 5 µl unverdünnt                          |
|        | CD59-PE    | 20 µl                                    |

Den Ansätzen 1 und 2 wurde anschließend jeweils 50 µl peripheres Vollblut zugegeben, bevor eine 15-minütige Inkubation erfolgte. Nach Zugabe von je 2 ml Lysing solution (1:10 verdünnt mit Aqua dest.) wurden die Proben für zehn Minuten erneut inkubiert und fünf Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden beide Ansätze mit 2 ml Cell-wash pelletiert. Nachdem der Überstand anschließend erneut abgesaugt und den Proben jeweils 0,5-1 ml Cell-wash zugefügt wurde, wurden die Proben bis zur Messung maximal eine Stunde im Kühlschrank aufbewahrt.

### **Erythrozytenfärbung:**

Die PNH-Diagnostik der Erythrozyten besteht aus einem Ansatz. Die Antikörper wurden nach folgendem Schema pipettiert:

**Tab. 6. Pipettierschema zur Erythrozytenfärbung**

| <b>Ansatz</b> | <b>Antikörper</b> | <b>Menge</b> |
|---------------|-------------------|--------------|
| 1             | Glykophorin A-PE  | 10 µl        |
|               | CD59-PE           | 20 µl        |

Den Antikörpern wurden 5 µl peripheres EDTA Blut und 100 µl PBS zugegeben. Die Blutverdünnung wurde dann für zehn Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml PBS wurde die Zellsuspension für fünf Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Erythrozytenlösung mit 2 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand erneut abgesaugt und dem Ansatz wurden 2 ml Cell-wash zugefügt. Die Probe wurde bis zur Messung maximal eine Stunde im Kühlschrank aufbewahrt.

### **Retikulozytenfärbung:**

Die durchflusszytometrische PNH-Diagnostik für Retikulozyten besteht aus drei Ansätzen. Zur Resuspension sedimentierter Zellen wurden die Blutröhrchen mindestens zehn Minuten auf einem Probenmischgerät bewegt. Anschließend wurden die Antikörper nach folgendem Schema pipettiert:

**Tab. 7. Pipettierschema zur Retikulozytenfärbung**

| <b>Ansatz</b> | <b>Antikörper</b> | <b>Menge</b> |
|---------------|-------------------|--------------|
| 1             | CD58-PE           | 20 µl        |
|               | ReticCount        | 1000 µl      |
| 2             | CD59-PE           | 20 µl        |
|               | ReticCount        | 1000 µl      |

Anschließend wurde eine Blutverdünnung aus 20 µl Blut und 980 µl PBS hergestellt. Jeweils 100 µl der Blutverdünnung wurden danach zu den Ansätzen 1-3 gegeben. Die Suspensionen wurden danach für 20-30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden den Ansätzen je 1 ml PBS hinzugefügt. Die Zellsuspensionen wurden dann zentrifugiert (8000 rpm) und gefärbt. Hierzu wurde zu den Ansätzen 1-3 jeweils 1000 µl ReticCount Lösung gegeben. Die Suspensionen wurden danach, bevor sie in Messröhrchen überführt werden konnten, 15-30 Minuten unter Lichtabschluss inkubiert. Bis zur Messung wurden die Proben maximal eine Stunde im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.5.2 Messeinstellungen

Die Standardmesseinstellung des Durchflusszytometers (hier: Calibur) für peripheres Blut wurde bei der Messung der Erythrozyten verwendet. Bei der Messung der Granulozyten wurden die Parameter FL1 und FL2 bei jedem Patienten und dem zugehörigen Normalspender leicht verändert bzw. individuell angepasst und bei den Folgemessungen beibehalten. Hierdurch erhielt man eine deutlichere Trennung der CD55- und CD59-positiven bzw. negativen Populationen. Die zu messende Gesamtzellzahl für die Erfassung von Erythrozyten und Granulozyten betrug jeweils 10.000, die für die Retikulozyten betrug jeweils 50.000. Die Messeinstellungen des Durchflusszytometers wurden wie unten angegeben vorgenommen.



**Tab. 8. Einstellungen des Durchflusszytometers bei den Erythrozyten- und Granulozytenmessungen**

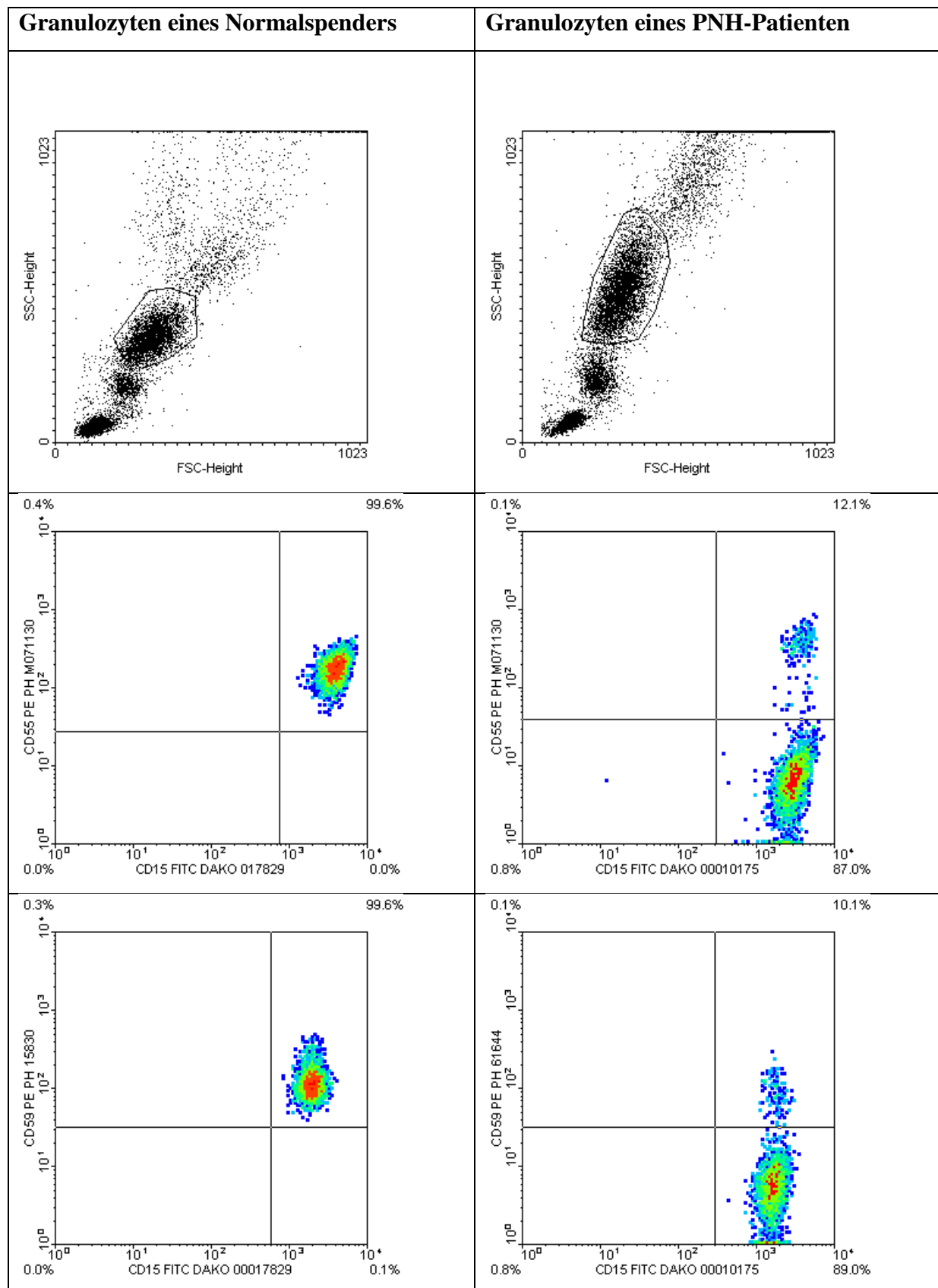
| Parameter | Detector | Voltage | AmpGain | Mode |
|-----------|----------|---------|---------|------|
| P1        | FSC      | E00     | 2,70    | Lin  |
| P2        | SSC      | 368     | 1,50    | Lin  |
| P3        | FL1      | 535     | 1,00    | Log  |
| P4        | FL2      | 494     | 1,00    | Log  |
| P5        | FL3      | 590     | 1,00    | Log  |

**Tab. 9. Einstellungen des Durchflusszytometers bei den Retikulozytenmessungen**

| Parameter | Detector | Voltage | AmpGain | Mode |
|-----------|----------|---------|---------|------|
| P1        | FSC      | E-1     | 7,83    | Log  |
| P2        | SSC      | 306     | 1,00    | Log  |
| P3        | FL1      | 799     | 1,00    | Log  |
| P4        | FL2      | 662     | 1,00    | Log  |
| P5        | FL3      | 150     | 1,00    | Log  |

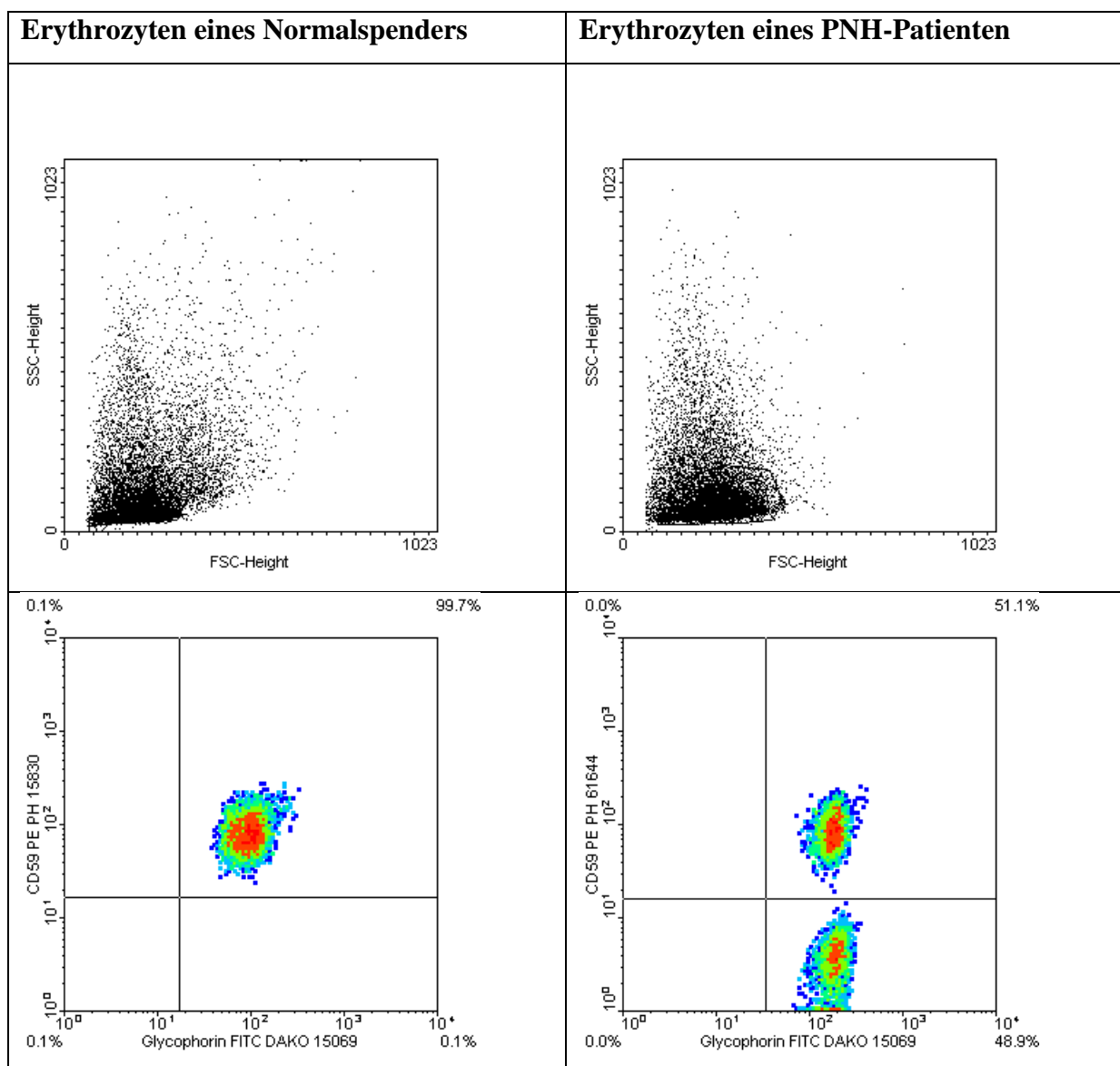
### 3.5.3 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Zur Auswertung der durchflusszytometrischen Daten wurde die CELLQuest ProSoftware (BD) verwendet. Diese kann jeder Zelle die Eigenschaften zuordnen, die über das oben beschriebene optische System erfasst werden. In der DotBlot-Darstellung werden die Ergebnisse in einem zweidimensionalen Koordinatensystem entsprechend der Achsenbeschriftungen dargestellt. Die Auftrennung erfolgt anhand der Größe und Granularität bzw. inneren Komplexität. Dabei bilden sich drei getrennte Zellansammlungen, welche die Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten des peripheren Blutes darstellen. Die Erythrozyten wurden lysiert und stellen sich deshalb nicht dar. Durch so genannte Regionen lassen sich die Zellgruppen weiter aufschlüsseln. Eine solche weiterführende Aufschlüsselung führten wir u.a. bei den Granulozyten durch. Anhand spezifischer Oberflächenmarker wurden diese in CD55- und CD59-positive bzw. negative Zellen aufgetrennt. Der statistischen Auswertung kann die prozentuale Verteilung der CD55- und CD 59-positiven und -negativen Zellen entnommen werden.



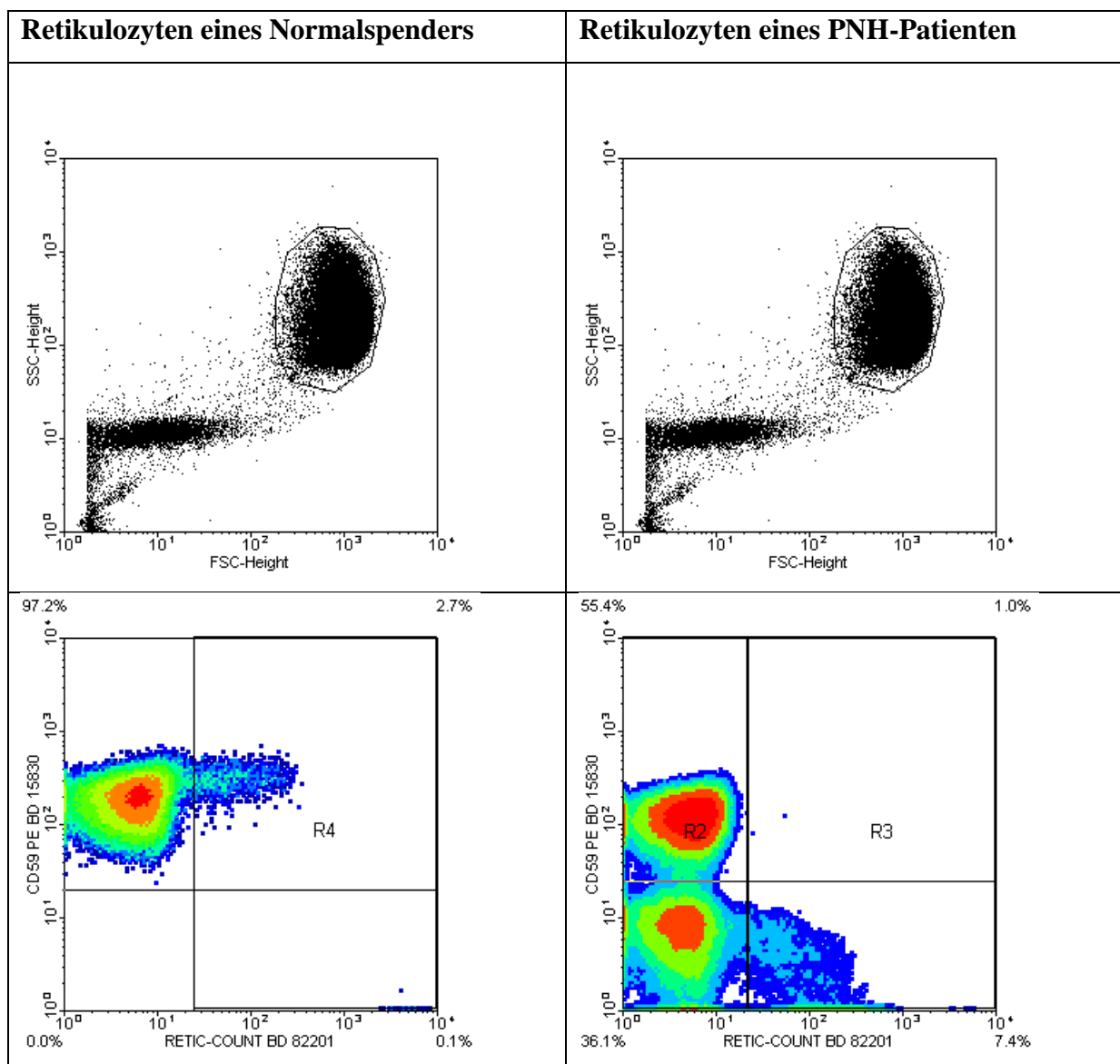
**Abb. 4. Durchflusszytometrische Analysen von CD59-positiven und negativen Granulozyten.** Die Granulozyten werden anhand ihrer Zellgröße und anhand ihrer Granularität von anderen leukozytären Subtypen unterschieden. Durch den Einsatz von Fluorchrom-markierten Antikörpern können Antigene (hier: CD 59) auf der Zelloberfläche von Granulozyten (CD15 positiv) nachgewiesen werden. Auf vielen Granulozyten des PNH-Patienten fehlt CD59; nur ein kleiner Anteil zeigt eine normale Expression.

Die Auswertung der Erythrozytenmessungen erfolgte ebenfalls mit der CellQuest Pro Software. In der DotBlot-Darstellung bildet sich nur eine Zellansammlung, da die Erythrozyten die mit Abstand größte Population darstellen und die anderen Zellgruppen hierbei nicht berücksichtigt werden. Durch Setzung eines Gates wird die Zellansammlung weiter eingegrenzt. Auch bei der Auswertung der Erythrozyten führten wir eine weiterführende Aufschlüsselung bezüglich des Oberflächenmoleküls CD59 durch. Die statistische Auswertung liefert auch hier den relativen Anteil der CD59-positiven und negativen Zellen.



**Abb. 5. Durchflusszytometrische Analysen von CD59-positiven und negativen Erythrozyten.** Da die Erythrozyten die mit Abstand größte Zellfraktion sind, werden die anderen Zellen bei dieser Messung vernachlässigt. Durch den Einsatz von Fluorchrom-markierten Antikörpern können Antigene (hier: CD 59) auf der Zelloberfläche von Erythrozyten (Glykophorin positiv) nachgewiesen werden. Auf vielen Erythrozyten des PNH-Patienten fehlt CD59; nur ein Teil zeigt eine normale Expression.

Die Retikulozytenmessungen wurden ebenfalls mit der CellQuest Pro Software ausgewertet. In der DotBlot Darstellung wird auch hier nur eine Zellansammlung sichtbar, die durch eine Region weiter eingegrenzt wird. Bei der weiteren Auswertung der CD58- und CD59-positiven bzw. negativen Zellen wurden zwei Gates gesetzt. So wurde eine getrennte Darstellung der Retikulozyten und der ReticCount negativen Zellen, die die Erythrozyten repräsentieren, ermöglicht.



**Abb. 6. Durchflusszytometrische Analysen von CD59-positiven und negativen Retikulozyten.** Die Retikulozyten werden in der DotPlot Darstellung zusammen mit den Erythrozyten dargestellt. Die Färbung mit ReticCount ermöglicht eine Unterscheidung der Retikulozyten von den Erythrozyten. Durch den Einsatz von Fluorchrom-markierten Antikörpern können Antigene (hier: CD 59) auf der Zelloberfläche von Retikulozyten (ReticCount positiv) nachgewiesen werden. Auf vielen Retikulozyten des PNH-Patienten fehlt CD59; nur ein sehr kleiner Anteil zeigt eine normale Expression.

### 3.6 Bestimmung der Standardlaborparameter

Die Bestimmung der Standardlaborparameter erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes. Wir untersuchten den Verlauf des Hämoglobinwertes und der Hämolysparameter Laktatdehydrogenase, Gesamtbilirubin und absolute Retikulozytenwerte, die sich nach der Formel  $\frac{\text{Retikulozyten (\%)} \times \text{Erythrozyten (/}\mu\text{l)}}{100}$  errechnen.

**Tab. 10. Bestimmung der Standardlaborparameter**

| Analyt        | Material | Vorbehandlung | Referenzbereich                        | Methode               |
|---------------|----------|---------------|--|-----------------------|
| LDH           | P        | Li-Heparin    | 0-262 U/l                              | IFCC liquid 37°C      |
| Bilirubin     | P        | Li-Heparin    | 0,1-1,0 mg/dl                          | DPD liquid            |
| Hb            | B        | EDTA          | M 14,0 - 18,0 g/dl<br>F 12,0-16,0 g/dl | Sysmex SF3000/XE 2100 |
| Retikulozyten | B        | EDTA          | 30-80/nl                               | XE 2100               |

### 3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS (Version 11.5) für Windows. Wegen der kleinen Fallzahl von sieben Studienteilnehmern und einer bei einigen Studienpatienten weiterhin bestehenden Transfusionsbedürftigkeit unter Eculizumabtherapie wurde der Schwerpunkt bei der Ergebnisdarstellung auf die deskriptive Analyse bzw. auf die Einzelfalldarstellungen gelegt. Die Variablen werden als Mittelwerte und Standardabweichung angegeben und mit Hilfe des Wilcoxon Rangsummentests für zwei verbundene Stichproben verglichen. Das Signifikanzniveau wurde bei 5 % festgesetzt. Ein möglicher Zusammenhang zwischen den verschiedenen Parametern wurde durch den Korrelationskoeffizienten nach Pearson (Test auf 2-seitige Signifikanz) überprüft.

---

## 4 Ergebnisse

---

### 4.1 Entwicklung der GPI-defizienten Erythrozyten unter Eculizumabtherapie

GPI-defiziente Erythrozyten wurden im Rahmen unserer Untersuchungen mit Hilfe eines „lineage“ Markers für Erythrozyten, einem anti-Glykophorin-Antikörper und mit Hilfe eines anti-CD59-Antikörpers nachgewiesen. Wir untersuchten die Entwicklung der Erythrozyten von PNH-Patienten mit fehlender Expression von GPI-verankerten Oberflächenmolekülen unter Therapie mit dem anti-C5-Antikörper Eculizumab. Durch die Bindung an den Komplementfaktor C5 hemmt Eculizumab die Formierung des Membranangriffskomplexes, wodurch die GPI-defizienten Erythrozyten vor der Lyse geschützt werden. Somit ist es interessant, diese anteilmäßig zu bestimmen.

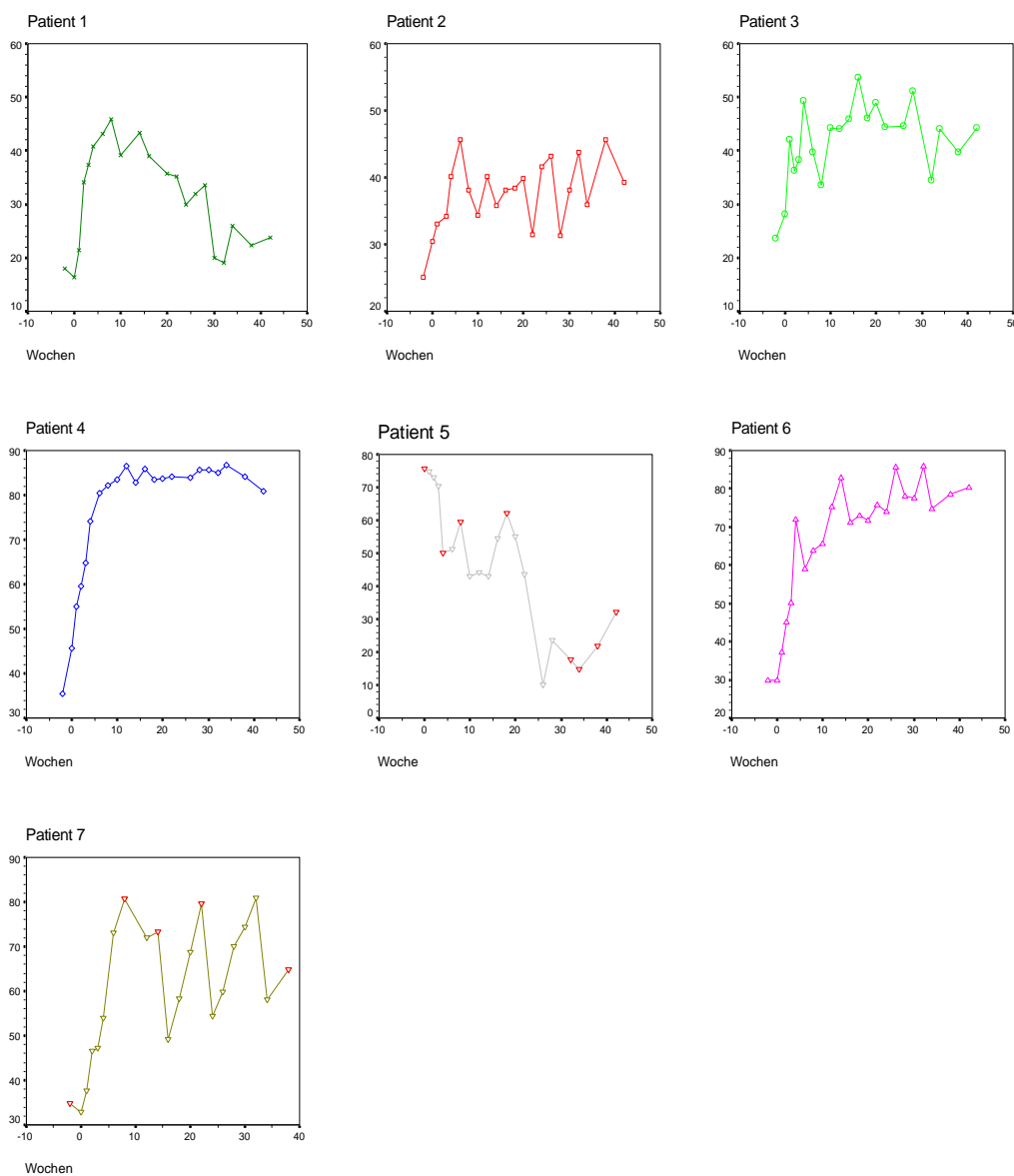
Auch Transfusionen mit Erythrozytenkonzentraten haben Einfluss auf die Größe der GPI-defizienten Erythrozytenfraktion, so dass bei der statistischen Auswertung die Transfusionsbedürftigkeit beachtet werden muss. Unter Berücksichtigung der geringen Fallzahl erfolgte eine Einteilung der Patienten nach dem jeweiligen Transfusionsstatus. Die Mittelwerte beziehen sich auf einen Zeitpunkt vor Therapiebeginn (Woche 0) und auf zwei Zeitpunkte unter Therapie (Woche 8 und Woche 34).

Bei den Studienteilnehmern zeigte sich ein Anstieg des Mittelwertes der GPI-defizienten Erythrozyten von 40,4 % vor Therapiebeginn auf 52,4 % nach 34 Wochen Antikörpertherapie ( $p=0,345$ ). In Woche 8 wurde ein Anteil an den GPI-defizienten Erythrozyten von 59,6 % gemessen. Bei den CD59-negativen Erythrozyten der unter Eculizumabtherapie nicht mit EKs transfundierten Studienteilnehmer wurde durchschnittlich eine Zunahme von 35,5 % (Woche 0) auf 54,4 % in Woche 8 und auf 60,3 % in Woche 34 beobachtet. Die GPI-defizienten Erythrozyten der beiden unter Eculizumabtherapie mit EKs transfundierten Studienteilnehmer wiesen bei einem Ausgangswert von 54,2 % vor Therapie nach acht Wochen Eculizumabgabe einen Anteil an den Gesamterthrozyten von 70,1 % auf. Im weiteren Verlauf kam es zu einem Rückgang der defizienten Zellfraktion bis auf 36,4 % ( $p=0,345$ ; Woche 34).

Aufgrund der geringen Fallzahl führten wir eine Einzelfallanalyse der GPI-defizienten Erythrozyten der sieben PNH-Studienpatienten durch.

Unter Antikörpertherapie konnte bei Patient 1 innerhalb eines Zeitraums von acht Wochen ein Anstieg der GPI-defizienten Erythrozytenfraktion (16,8 % in Woche 0) auf etwa das Dreifache des Ausgangswertes (45,9 % in Woche 8) beobachtet werden. Obwohl der Patient während der Eculizumabtherapie keine Bluttransfusionen erhielt, kam es nach Woche 8 zu einem Rückgang der Typ-III-Erythrozyten. Nach 30 Wochen Therapie betrug der Anteil dieser Zellen 19,0 %. Der Ausgangswert der GPI-defizienten Zellfraktion von 16,3 % wurde während des weiteren Untersuchungszeitraums nicht unterschritten. Die CD59-negativen Erythrozyten von Proband 2 zeigten unter Eculizumabtherapie einen wechselhaften Verlauf. Bei Therapieeinleitung (Woche 0) betrug der Anteil der GPI-defizienten Erythrozyten 30,5 %. Innerhalb von sechs Wochen kam es zu einem Anstieg der Zellen auf 45,7 %. Im weiteren Verlauf bewegte sich der Anteil GPI-defizienter Erythrozyten zwischen 45,7 % und 30 %. Unter Eculizumabtherapie waren keine Bluttransfusionen erforderlich. Patient 3 zeigte eine ähnliche Entwicklung der CD59-negativen Erythrozyten wie Patient 2. Insgesamt wurde unter Antikörpertherapie ein Anstieg dieser Zellfraktion erzielt. Im Verlauf traten deutliche Schwankungen der GPI-defizienten Erythrozytenfraktion auf. Ein Rückgang der CD59-negativen Zellen bis auf den Ausgangswert von Woche 0 (28,2 %) wurde nicht beobachtet. Nach 16 Wochen Eculizumabtherapie wurde ein Maximum von 53,6 % GPI-defizienten Erythrozyten gemessen. Während der Antikörpertherapie erhielt der Patient keine Erythrozytenkonzentrate. Bei Patient 4 kam es unter Eculizumabtherapie zunächst zu einem kontinuierlichen Anstieg der GPI-defizienten Erythrozyten. Nach acht Wochen Antikörpertherapie betrug der Anteil an GPI-defizienten Erythrozyten >80 %. Während des weiteren Untersuchungszeitraums wurde keine wesentliche Änderung des GPI-defizienten Erythrozytenanteils beobachtet. Der Patient erhielt während der Antikörpertherapie keine Erythrozytenkonzentrate. Der Anteil an GPI-defizienten Erythrozyten von Patient 5 betrug vor Einleitung der Therapie mit Eculizumab 75,6 %. Der Ausgangswert wurde vor Transfusion von zwei EKs bestimmt. Nach Therapiebeginn kam es zu einem Rückgang der genannten Zellfraktion bis auf 10 % (Woche 26). Patient 5, der an einer PNH und an einer AA erkrankt ist, erhielt auch unter anti-C5-Antikörpertherapie regelmäßig EKs. Die Transfusionszeitpunkte stehen nur bedingt in einem zeitlichen Zusammenhang mit dem Rückgang des defizienten Zellklons. Zu Beginn der Antikörpertherapie kam es bei Patient 6

zu einem Anstieg der CD59-negativen Erythrozyten von etwa 30 % auf > 70 %. Die GPI-defizienten Erythrozyten von Patient 6 verhielten sich in ihrer Entwicklung ähnlich wie die von Patient 4, der unter Eculizumabtherapie keine EKs erhielt. Die GPI-defiziente Erythrozytenfraktion von Patient 7 stieg von 32,8 % vor Therapieeinleitung bis auf 80,6 % in Woche 8 an. In den folgenden Therapiewochen kam es zu einem Abfall der CD59-negativen Erythrozytenfraktion bis auf 49,1 % (Woche 16). Im weiteren Therapieverlauf traten Schwankungen der von dem GPI-Ankerdefekt betroffenen Erythrozyten zwischen 50 % und 80 % auf. Diese standen nur teilweise im zeitlichen Zusammenhang zu den Transfusionen mit Erythrozytenkonzentraten, die der Patient während der Antikörpertherapie fünf Mal erhielt.



**Abb. 7. Entwicklung der GPI-defizienten Erythrozyten unter Eculizumabtherapie.** Pat. 1-4 und 6 erhielten nach Therapieeinleitung keine EKs; Pat. 5 und 7 erhielten nach Therapieeinleitung weiterhin EKs. Die jeweiligen Transfusionszeitpunkte mit 2 EKs sind rot markiert.



**Tab. 11. Entwicklung der GPI-defizienten Erythrozyten der einzelnen PNH-Patienten unter Eculizumabtherapie**

|           | GPI-defiziente Erythrozyten (%) |         |          |
|-----------|---------------------------------|---------|----------|
|           | Woche 0                         | Woche 8 | Woche 34 |
| Patient 1 | 16,3                            | 45,9    | 26,0     |
| Patient 2 | 30,5                            | 38,1    | 35,9     |
| Patient 3 | 28,2                            | 33,5    | 44,0     |
| Patient 4 | 45,6                            | 82,2    | 86,8     |
| Patient 5 | 75,6                            | 59,5    | 14,8     |
| Patient 6 | 29,8                            | 63,9    | 74,4     |
| Patient 7 | 32,8                            | 80,6    | 58,0     |

**Tab. 12. Entwicklung der GPI-defizienten Erythrozyten unter Eculizumabtherapie**

|                                 | GPI-defiziente Erythrozyten (%)         |               |               |                     |
|---------------------------------|---|---------------|---------------|---------------------|
|                                 | Woche 0                                 | Woche 8       | Woche 34      | p-Wert <sup>6</sup> |
| Alle Patienten <sup>1</sup>     | 40,4 <sup>4</sup> +/- 18,3 <sup>5</sup> | 59,6 +/- 20,5 | 52,4 +/- 26,3 | 0,345               |
| Patienten ohne EKs <sup>2</sup> | 33,5 +/- 8,1                            | 54,4 +/- 22,8 | 60,3 +/- 24,3 | 0,068               |
| Patienten mit EKs <sup>3</sup>  | 54,2 +/- 30,3                           | 70,1 +/- 14,9 | 36,4 +/- 30,5 | n.b.                |

<sup>1</sup> n = 6 ( Patienten 2-7)

<sup>2</sup> n = 4 ( Patienten 2,3,4 und 6)

<sup>3</sup> n = 2 ( Patienten 5 und 7)

<sup>4</sup> Mittelwert

<sup>5</sup> Standardabweichung

<sup>6</sup> p-Wert: asymptotische Signifikanz; 2-seitig; Wilcoxon Rangsummentest für zwei verbundene Stichproben; signifikanter Zusammenhang zwischen Anteil an GPI-defizienten Erythrozyten in Woche 0 und in Woche 34.

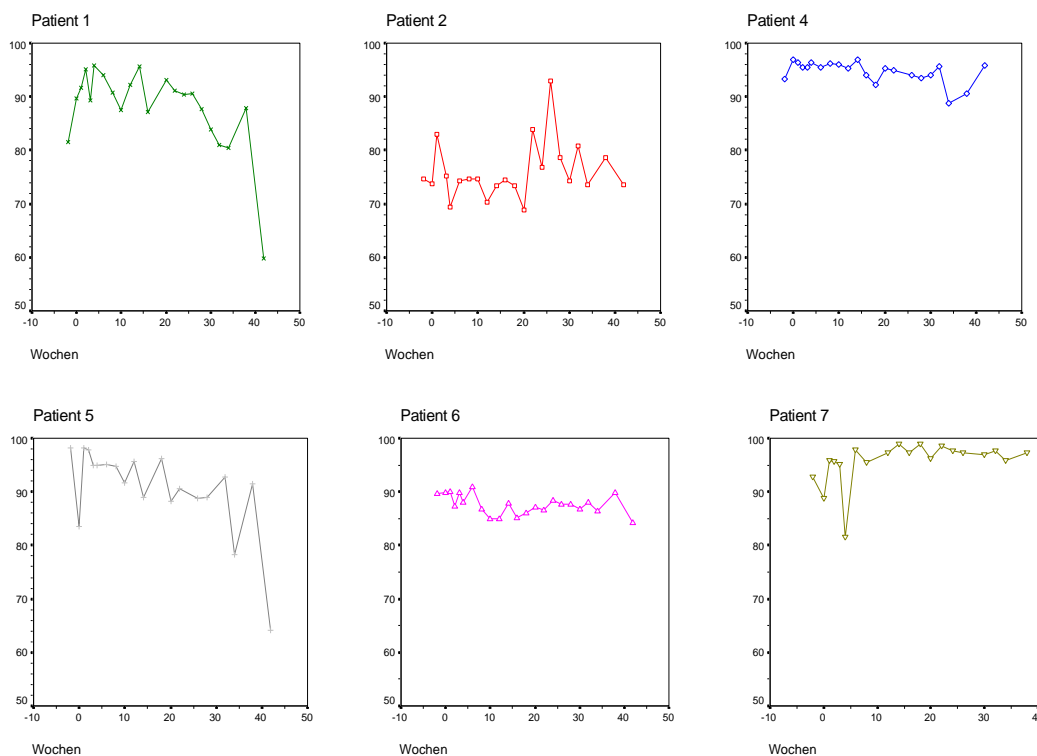
## 4.2. Entwicklung der GPI-defizienten Granulozyten unter Eculizumabtherapie

Der prozentuale Anteil der Granulozyten mit Defizienz der GPI-verankerten Proteine wurde durch die Ansätze CD15/CD55 und CD15/CD59 bestimmt. Aufgeführt werden nur die

---

Ergebnisse der Messungen von CD15/CD59, da sich dieser Ansatz im Rahmen unserer Untersuchungen als besonders zuverlässig erwiesen hat. Wir führten die durchflusszytometrischen Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen Änderung des GPI-defizienten Granulozytenanteils unter Eculizumabtherapie durch.

Sowohl vor Therapieeinleitung als auch in Woche 8 und in Woche 34 zeigte sich ein durchschnittlicher Anteil an PNH-Granulozyten von  $> 80\%$ . Unter Eculizumabtherapie traten Größenschwankungen der GPI-defizienten Granulozytenfraktion auf. Bei den Patienten 1 und 5 kam es am Ende des Beobachtungszeitraums zu einem Rückgang des defizienten Granulozytenanteils. Ein eindeutiger Trend im Sinne einer Zu- oder Abnahme der CD59-negativen Granulozyten wurde bei den sieben PNH-Patienten jedoch nicht beobachtet. Zwischen den unter Antikörpertherapie mit EKs auftransfunden und den unter Antikörpertherapie nicht transfunden Studienteilnehmern zeigte sich kein relevanter Unterschied bezüglich der Größenentwicklung der GPI-defizienten Granulozytenfraktion. Anhand der Standardabweichungen ist eine geringe Streuung der GPI-defizienten Granulozyten der verschiedenen Studienteilnehmer um die errechneten Mittelwerte zu erkennen. Lediglich bei einem Patienten (Pat. 2), der an einer primär hämolytischen Verlaufsform der PNH erkrankt ist, war der Anteil der GPI-defizienten Granulozyten geringer als bei den anderen Studienteilnehmern.



**Abb. 8. Entwicklung der GPI-defizienten Granulozyten unter Eculizumabtherapie.** Pat. 1-4 und 6 erhielten nach Therapieeinleitung keine EKs; Pat. 5 und 7 erhielten nach Therapieeinleitung weiterhin EKs.

**Tab. 13. Entwicklung der GPI-defizienten Granulozyten unter Eculizumabtherapie**

|                                 | GPI-defiziente Granulozyten (%)        |              |               |                     |
|---------------------------------|--|--------------|---------------|---------------------|
|                                 | Woche 0                                | Woche 8      | Woche 34      | p-Wert <sup>6</sup> |
| Alle Patienten <sup>1</sup>     | 87,1 <sup>4</sup> +/- 7,8 <sup>5</sup> | 89,8 +/- 8,2 | 83,9 +/- 8,0  | 0,173               |
| Patienten ohne EKs <sup>2</sup> | 87,6 +/- 9,8                           | 87,1 +/- 9,2 | 82,3 +/- 6,8  | 0,068               |
| Patienten mit EKs <sup>3</sup>  | 86,2 +/- 3,6                           | 95,1 +/- 0,4 | 87,1 +/- 12,5 | n.b.                |

<sup>1</sup> n=6 (Patienten 1, 2, 4, 5, 6 und 7)

<sup>2</sup> n=4 (Patienten 1, 2, 4 und 6)

<sup>3</sup> n=2 (Patienten 5 und 7)

<sup>4</sup> Mittelwert

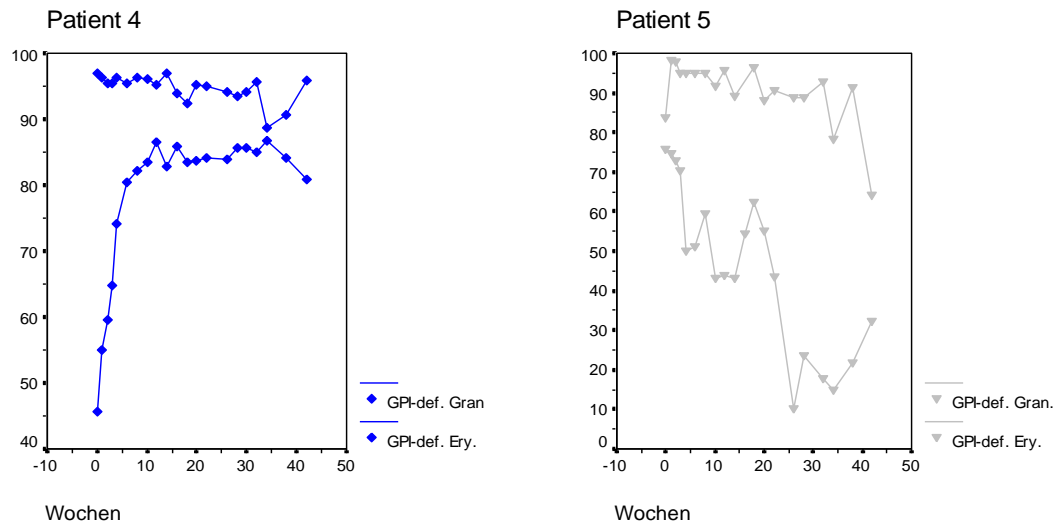
<sup>5</sup> Standardabweichung

<sup>6</sup> p-Wert: asymptotische Signifikanz; 2-seitig; Wilcoxon Rangsummentest für zwei verbundene Stichproben; bezieht sich auf GPI-defizienten Granulozyten in Woche 0 und in Woche 34

### **4.3 Entwicklung der GPI-defizienten Erythrozyten im Vergleich zur Entwicklung der GPI-defizienten Granulozyten unter Eculizumabtherapie**

Die Entwicklung der GPI-defizienten Erythrozyten und die der GPI-defizienten Granulozyten unter Eculizumabtherapie verlief unterschiedlich. Während bei den GPI-defizienten Granulozyten keine eindeutige Zu- oder Abnahme beobachtet werden konnte (s. 4.2), kam es bei einigen Studienteilnehmern zu einer Zunahme des GPI-defizienten Erythrozytenanteils (s. 4.1).

Exemplarisch wird der Verlauf beider Zellfraktionen bei einem nach Einleitung der Antikörpertherapie transfusionsunabhängigen (Pat. 4) und bei einem nach Therapieeinleitung weiterhin transfusionspflichtigen PNH-Patienten (Pat.5) graphisch dargestellt. Bei beiden Patienten zeigte sich ein weitestgehend unveränderter Anteil an GPI-defizienten Granulozyten. Bei Patient 4 wurde zu Beginn der Antikörpertherapie eine Zunahme der GPI-defizienten Erythrozyten auf  $> 80\%$  beobachtet. Diese hielten sich im weiteren Verlauf auf diesem Niveau. Der GPI-defiziente Granulozytenanteil des o.g. Patienten wies keine eindeutige Größenänderung unter Gabe des Antikörpers auf. Bei dem unter Eculizumabtherapie weiterhin transfusionspflichtigen Patienten 5 kam es in Therapiewoche 38 zu einem Abfall der GPI-defizienten Granulozyten von  $91,4\%$  auf  $64,2\%$ . Diesem Ereignis ging ein Rückgang der GPI-defizienten Erythrozyten bis auf  $< 10\%$  voraus. Am Ende des Beobachtungszeitraums wurde etwa zeitgleich zu dem oben beschriebenen Rückgang der defizienten Granulozyten ein signifikanter Anstieg der GPI-defizienten Erythrozyten beobachtet.



**Abb. 9. Entwicklung der GPI-defizienten Erythrozyten und der GPI-defizienten Granulozyten unter Eculizumabtherapie im direkten Vergleich.** Pat. 4 erhielt nach Therapieeinleitung keine Eks; Pat. 5 erhielt nach Therapieeinleitung weiterhin EKs.

#### 4.4 Entwicklung der GPI-defizienten Retikulozyten unter Eculizumabtherapie

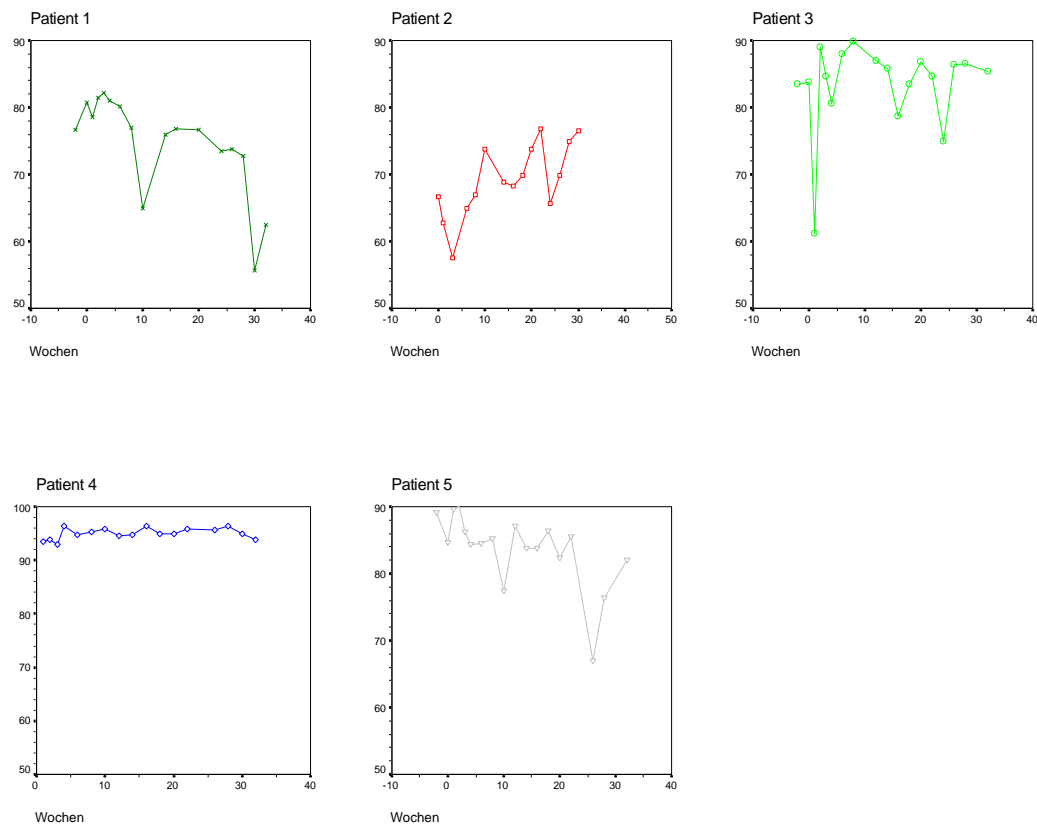
Da es bei der PNH zu einer klonalen Expansion der mutierten hämatopoetischen Stammzellen kommt, kann das Fehlen der GPI-assoziierten Oberflächenproteine in allen Entwicklungsstufen einer Blutzellreihe nachgewiesen werden. Dies gilt auch für die direkt aus dem Knochenmark freigesetzten „jugendlichen“ Erythrozyten, die Retikulozyten. Zur Quantifizierung der GPI-defizienten Retikulozyten wird der Anteil der ReticCount-positiven, CD59-negativen Zellen erfasst. Die Messung von CD58 diente lediglich der Bestätigung der CD59-Ergebnisse. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden bei den Patienten 1-5 vorgenommen. Aufgrund der kleinen Fallzahl von fünf Patienten wurden hier keine Untersuchungen auf statistische Signifikanz durchgeführt.

Durchflusszytometrisch zeigte sich unter Eculizumabtherapie bei den GPI-defizienten Retikulozyten ähnlich wie bei den GPI-defizienten Granulozyten keine wesentliche Änderung der Zellfraktion. Die Größe der von dem GPI-Ankerdefekt betroffenen Retikulozytenfraktion der verschiedenen Studienteilnehmer variierte unter Eculizumabtherapie jedoch erheblich. Eine ähnlich breite Spannweite bezüglich der Größe des defizienten Zellanteils wurde bereits

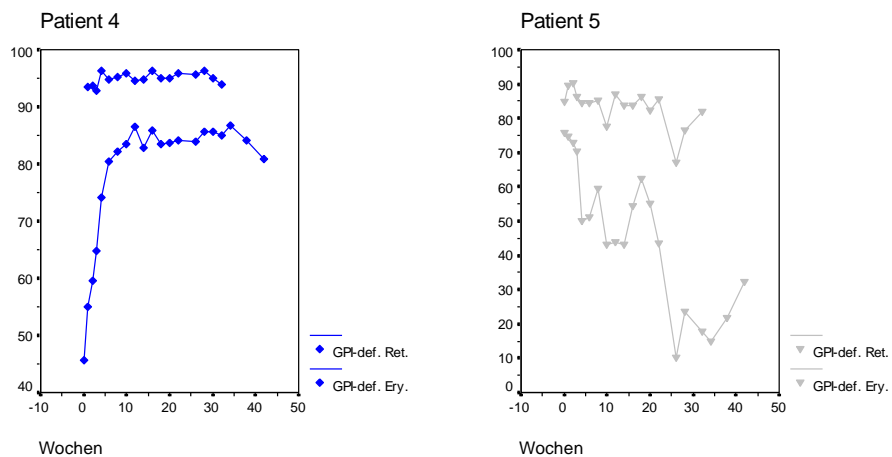
---

bei den Erythrozyten beobachtet (s.o.). Die GPI-defiziente Zellfraktion war bei den Retikulozyten im Durchschnitt größer als bei den Erythrozyten.

Die Entwicklung der PNH-Retikulozyten unter Antikörpertherapie wies neben einigen Gemeinsamkeiten wesentliche Unterschiede zu der der PNH-Erythrozyten auf. Sowohl bei den Erythrozyten als auch bei den Retikulozyten von Patient 1 wurde unter Antikörpertherapie ein Rückgang der defizienten Zellen beobachtet. Ein vorübergehender Anstieg der GPI-defizienten Zellen zu Beginn der Antikörpertherapie wurde lediglich bei den Erythrozyten, jedoch nicht bei den Retikulozyten beobachtet. Bei den zuletzt Genannten zeigte sich bereits kurz nach Therapiebeginn ein Rückgang der von dem GPI-Anker-Defekt betroffenen Zellen. Bei den Patienten 2 und 3 wiesen die PNH-Retikulozyten unter Antikörpergabe stärkere Schwankungen als die PNH-Erythrozyten auf. Der Anteil der GPI-defizienten Zellen war bei den Retikulozyten dieser Patienten im Durchschnitt größer als bei den Erythrozyten. Bei Patient 2 war im Verlauf der Therapie ein Anstieg der defizienten Retikulozyten festzustellen, wohingegen bei Patient 3 keine eindeutige Entwicklung im Sinne einer Zu- oder Abnahme der betroffenen Retikulozyten beobachtet werden konnte. Lediglich bei Patient 4 war ein weitestgehend konstant hohes Niveau der defizienten Retikulozyten, ähnlich wie bei den defizienten Erythrozyten zu erkennen. Bei Patient 5, einem unter Eculizumabtherapie häufig mit EKs transfundierten Probanden, der sowohl an einer aplastischen Anämie als auch an einer PNH erkrankt ist, wurde bei den Retikulozyten ähnlich wie bei den Erythrozyten ein Rückgang der CD59-negativen Zellen verzeichnet. Diese Entwicklung wurde bei den Retikulozyten wenige Wochen später als bei den Erythrozyten beobachtet. Wie auch bei den anderen Studienteilnehmern war der Anteil der defizienten Zellen von Patient 5 bei den Retikulozyten durchschnittlich größer als bei den Erythrozyten.



**Abb. 10. Entwicklung der GPI-defizienten Retikulozyten unter Eculizumabtherapie.** Pat. 1-4 erhielten nach Therapieeinleitung keine Eks; Pat.5 erhielt nach Therapieeinleitung weiterhin EKs.



**Abb. 11. Entwicklung der GPI-defizienten Erythrozyten und der GPI-defizienten Retikulozyten unter Eculizumabtherapie im direkten Vergleich.** Pat. 4 erhielt nach Therapieeinleitung keine Eks; Pat.5 erhielt nach Therapieeinleitung weiterhin EKs.

**Tab. 14. Entwicklung der GPI-defizienten Retikulozyten unter Eculizumabtherapie**

|                                 | <b>GPI-defiziente Retikulozyten (%)</b> |                |                 |
|---------------------------------|---|----------------|-----------------|
|                                 | <b>Woche 0</b>                          | <b>Woche 8</b> | <b>Woche 34</b> |
| Alle Patienten <sup>1</sup>     | 81,8 <sup>4</sup> +/-9,71 <sup>5</sup>  | 82,8+/- 11,2   | 80,0 +/-11,7    |
| Patienten ohne EKs <sup>2</sup> | 81,1 +/-11,1                            | 82,2, +/-12,8  | 79,5 +/-13,4    |
| Patienten mit EKs <sup>3</sup>  | 84,7                                    | 84,5           | 82,0            |

<sup>1</sup> n=5 (Patienten: 1,2,3,4 und 5)

<sup>2</sup> n= 4 (Patienten 1,2,3 und 4)

<sup>3</sup> n=1 (Patient 5)

<sup>4</sup> Mittelwert

<sup>5</sup> Standardabweichung

#### **4.5 Entwicklung der absoluten Retikulozytenwerte unter Eculizumabtherapie**

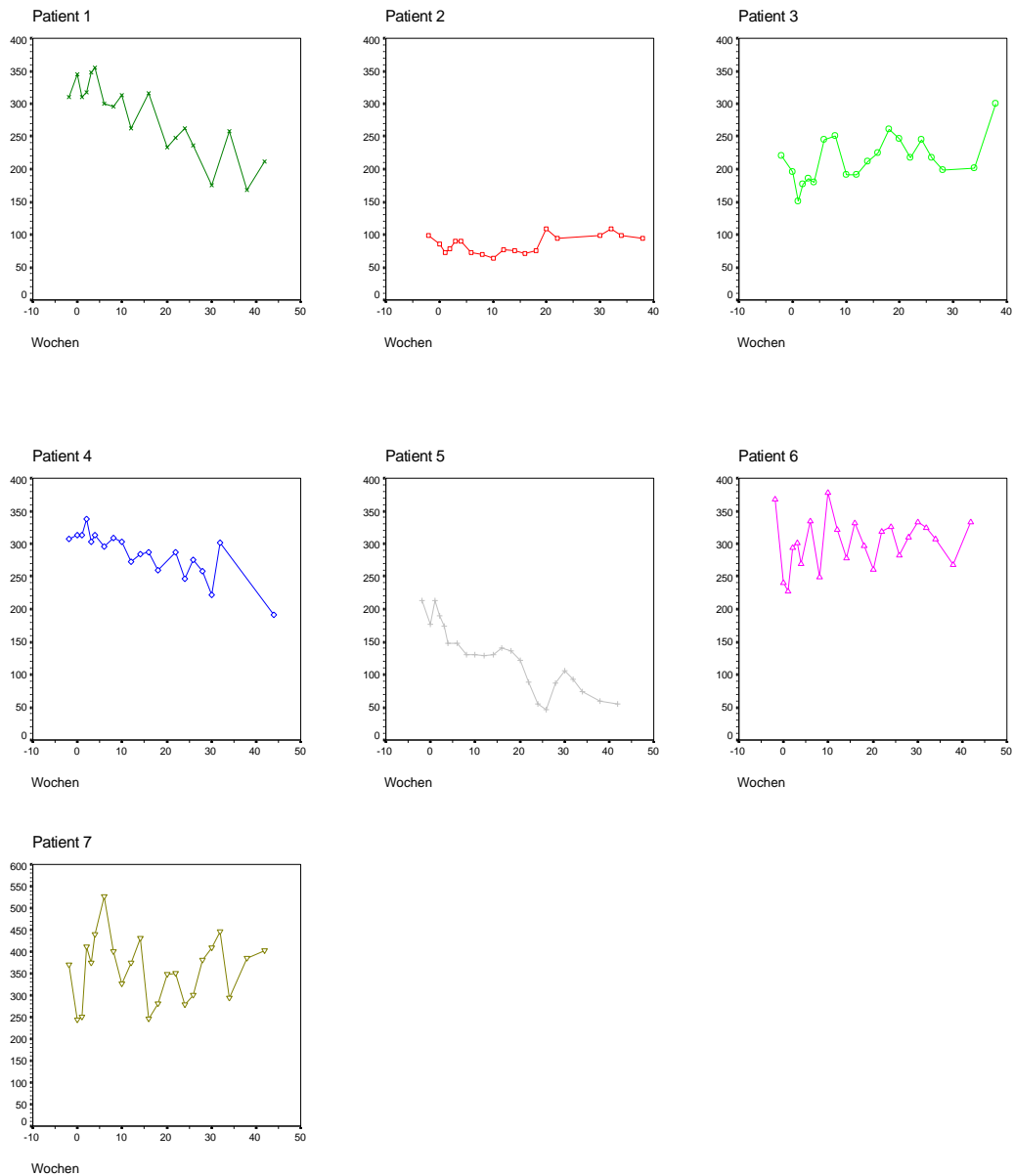
Die Indikation zur Retikulozytenmessung ist u.a. bei aplastischen und hämolytischen Anämien gegeben. Bei hämolytischen Anämien wie der PNH kommt es aufgrund des hohen Verbrauchs der Erythrozyten zu einer reaktiven Stimulation der Erythropoese mit Anstieg der Retikulozyten im peripheren Blut.

Die absoluten Retikulozytenwerte der Studienteilnehmer waren durchschnittlich sowohl vor (Woche 0) als auch unter Eculizumabtherapie (Woche 8 und Woche 34) erhöht. Eine eindeutige Zu- und Abnahme der Retikulozyten wurde während des Untersuchungszeitraumes bei den unter Antikörpertherapie transfusionsunabhängigen Studienpatienten durchschnittlich nicht beobachtet. Bei den beiden unter Therapie weiterhin transfusionspflichtigen Studienteilnehmern (Pat. 5 und 7) wurde sowohl in Woche 8 als auch in Woche 34 ein geringer Rückgang der Retikulozyten verzeichnet.

Im Rahmen unserer Untersuchungen zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl der Retikulozyten und der Größe des GPI-defizienten Retikulozytenklons ( $p<0,05$ ). Die Kurvenverläufe (Abb.15) verdeutlichen, dass die Retikulozyten der unter Eculizumabtherapie transfusionsunabhängigen Patienten während des gesamten



Untersuchungszeitraums erhöht waren. Eine Ausnahme hiervon bildet Patient 2, der unter Antikörpertherapie relativ niedrige und gering schwankende Retikulozytenwerte von ca. 70 bis 120/nl aufwies. Bei den übrigen unter Eculizumabtherapie transfusionsfreien Patienten traten deutlichere Schwankungen der stark erhöhten Retikulozyten auf. Es ließ sich keine statistisch signifikante Zu- oder Abnahme der Retikulozyten nach 34 Wochen Antikörpertherapie nachweisen ( $p=0,917$ ). Die beiden unter Antikörpertherapie mit EKs transfundierten Studienteilnehmer (Pat. 5 und 7) zeigten sehr unterschiedliche Verläufe der Retikulozyten. Bei Patient 5 kam es zu einer Abnahme der Retikulozyten, so dass in der zweiten Hälfte des Beobachtungszeitraums wiederholt im Normbereich liegende Werte gemessen wurden. Im Gegensatz hierzu wiesen die Retikulozyten von Patient 7 im Verlauf starke Schwankungen auf und waren zu jedem Messzeitpunkt deutlich erhöht.



**Abb. 12. Entwicklung der absoluten Retikulozytenwerte unter Eculizumabtherapie.** Pat. 1-4 und 6 erhielten nach Therapieeinleitung keine Eks; Pat. 5 und 7 erhielten nach Therapieeinleitung weiterhin EKs.

**Tab. 15. Entwicklung der absoluten Retikulozytenwerte unter Eculizumabtherapie**

|                                 | Retikulozyten(/nl)                      |               |               |                     |
|---------------------------------|---|---------------|---------------|---------------------|
|                                 | Woche 0                                 | Woche 8       | Woche 34      | p-Wert <sup>6</sup> |
| Alle Patienten <sup>1</sup>     | 228,4 <sup>4</sup> +/-87,0 <sup>5</sup> | 243,2+/-111,3 | 205,4 +/-99,6 | 0,917               |
| Patienten ohne EKs <sup>2</sup> | 235,6+/-102,8                           | 234,7+/-95,9  | 216,5+/-89,6  | 0,715               |
| Patienten mit EKs <sup>3</sup>  | 210,5+/-47,7                            | 264,4+/-190,4 | 138,3+/-155,1 | n.b.                |

1 n=7 ( Patienten 1-7)

2 n=5 (Patienten 1-4 und 6)

3 n=2 (Patienten 5 und 7)

4 Mittelwert

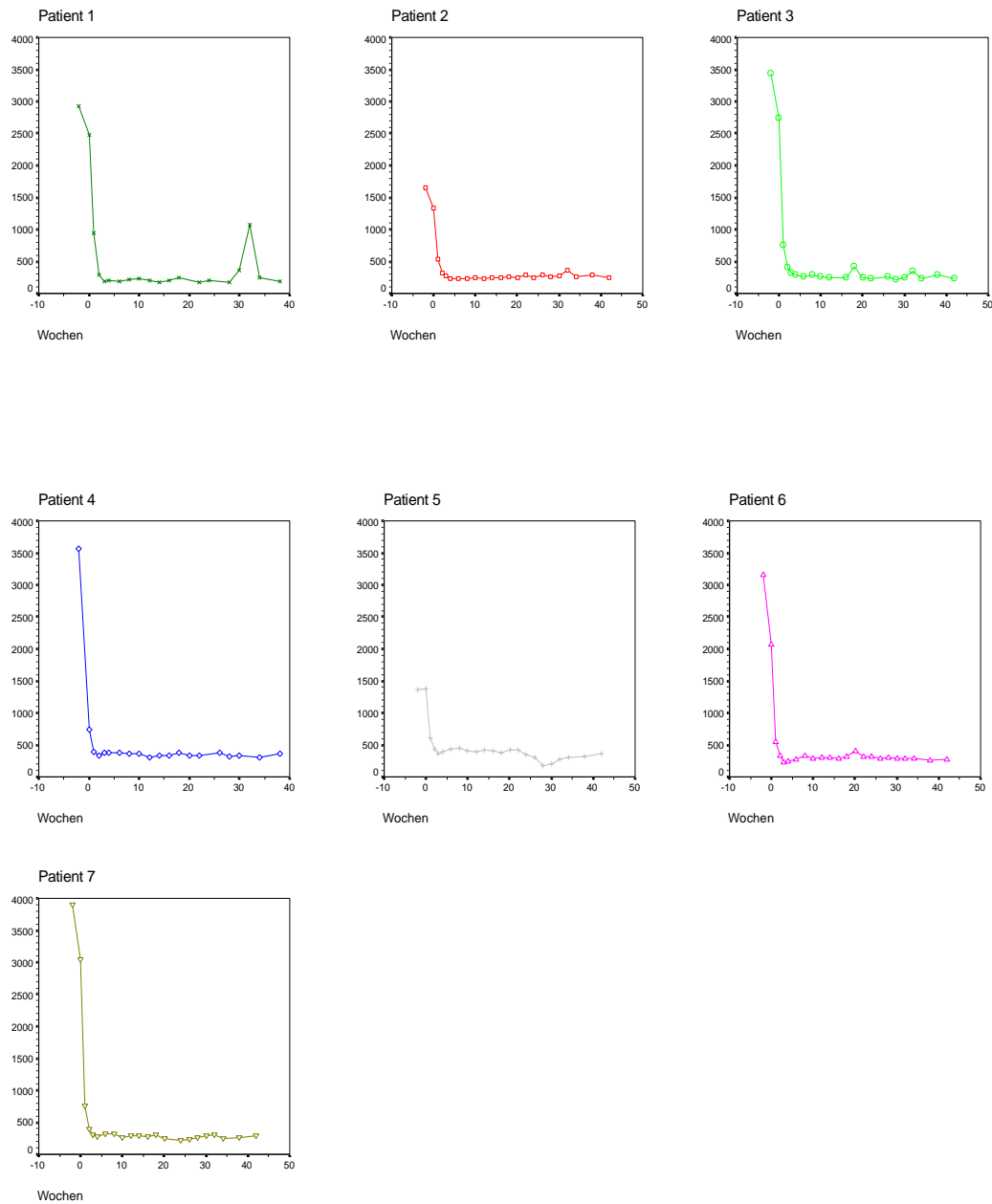
5 Standardabweichung

6 p-Wert: asymptotische Signifikanz; 2-seitig; Wilcoxon Rangsummentest für zwei verbundene Stichproben; bezieht sich auf die absoluten Retikulozytenwerte in Woche 0 und in Woche 34

#### 4.6 Entwicklung der LDH-Werte unter Eculizumabtherapie

Das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) ist bei intravasalen hämolytischen Anämien wie der PNH stark erhöht und gilt als ein für die Aktivität der Erkrankung relevanter Verlaufsparemeter. Ein LDH-Wert von bis zu 262 U/l gilt in unserem Labor als Normalwert.

Unter anti-C5-Antikörpertherapie zeigte sich bei allen Studienteilnehmern unabhängig von der Transfusionsbedürftigkeit ein signifikanter Rückgang der vor Therapiebeginn massiv erhöhten LDH ( $p < 0,05$ ). Kurz nach Therapieeinleitung kam es zu einem starken Abfall dieses Parameters; der durchschnittliche LDH-Wert nach acht Wochen Therapie betrug 312,3 U/l. Im weiteren Therapieverlauf war dieser Hämolyseparameter weiterhin leicht rückläufig (269,7 U/l in Woche 34). Eine vollständige Normalisierung des Enzyms wurde nicht erreicht. Bei einem Studienteilnehmer (Pat.1) wurde zwischen Woche 25 und Woche 30 ein vorübergehender Anstieg der LDH beobachtet.



**Abb. 13. Entwicklung der LDH-Werte unter Eculizumabtherapie.** Pat. 1-4 und 6 erhielten nach Therapieeinleitung keine Eks; Pat. 5 und 7 erhielten nach Therapieeinleitung weiterhin EKs.

**Tab. 16. Entwicklung der LDH-Werte unter Eculizumabtherapie**

|                                 | LDH-Werte (U/l)                            |                |                | p-Wert <sup>6</sup> |
|---------------------------------|--|----------------|----------------|---------------------|
|                                 | Woche 0                                    | Woche 8        | Woche 34       |                     |
| Alle Patienten <sup>1</sup>     | 1968,0 <sup>4</sup> +/- 847,9 <sup>5</sup> | 312,3 +/- 82,1 | 269,7 +/- 33,8 | 0,018               |
| Patienten ohne EKs <sup>2</sup> | 1870,8 +/- 827,7                           | 285,0 +/- 68,6 | 266,6 +/- 34,2 | 0,043               |
| Patienten mit EKs <sup>3</sup>  | 2211,0 +/- 1186,5                          | 380,5 +/- 92,6 | 277,5 +/- 44,5 | n.b.                |

1 n=7 (Patienten 1-7)

2 n=5 (Patienten 1-4 und 6)

3 n=2 (Patienten 5 und 7)

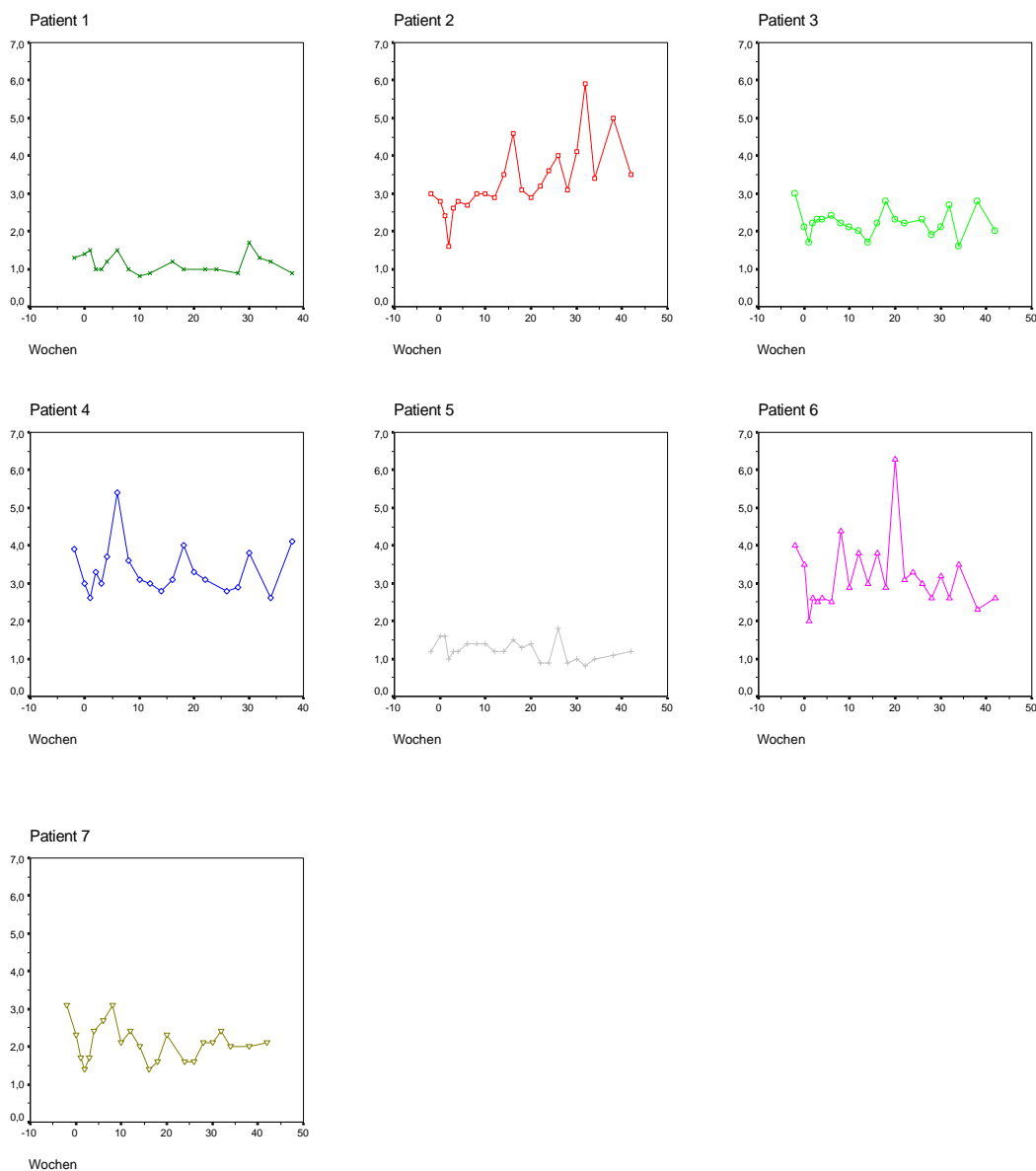
4 Mittelwert

5 Standardabweichung

6 p-Wert: asymptotische Signifikanz; 2-seitig; Wilcoxon Rangsummentest für zwei verbundene Stichproben; bezieht sich auf die LDH-Werte in Woche 0 und in Woche 34

## 4.7 Entwicklung des Gesamtbilirubins unter Eculizumabtherapie

Sowohl vor Therapiebeginn (Woche 0) als auch unter Therapie (Woche 8 und Woche 34) lag das Gesamtbilirubin bei den transfusionsbedürftigen sowie bei den unter Eculizumabtherapie nicht transfusionsbedürftigen Studienpatienten durchschnittlich oberhalb des Referenzwertes (>1,1mg/dl). Lediglich bei zwei Studienteilnehmern (Pat. 1 und 5) wurden vor und unter Therapie normwertige oder nur leicht über der Norm liegende, weitestgehend stabile Bilirubinwerte beobachtet. Die übrigen Studienteilnehmer wiesen im Verlauf zum Teil erhebliche Schwankungen mit Bilirubinspitzenwerten von > 5 mg/dl auf. Unter Antikörpertherapie wurde durchschnittlich keine statistisch signifikante Änderung dieses Parameters nachgewiesen.



**Abb. 14. Entwicklung des Gesamtbilirubins unter Eculizumabtherapie.** Pat. 1-4 und 6 erhielten nach Therapieeinleitung keine Eks; Pat. 5 und 7 erhielten nach Therapieeinleitung weiterhin EKs.

**Tab. 17. Entwicklung des Gesamtbilirubins unter Eculizumabtherapie**

|                                 | Bilirubin (mg/dl)                     |             |            |                     |
|---------------------------------|---------------------------------------|-------------|------------|---------------------|
|                                 | Woche 0                               | Woche 8     | Woche 34   | p-Wert <sup>6</sup> |
| Alle Patienten <sup>1</sup>     | 2,4 <sup>4</sup> +/- 0,8 <sup>5</sup> | 2,7 +/- 1,2 | 2,1+/-1,0  | 0,293               |
| Patienten ohne EKs <sup>2</sup> | 2,6 +/- 0,8                           | 2,8 +/- 1,3 | 2,4+/- 1,0 | 0,715               |
| Patienten mit EKs <sup>3</sup>  | 2,0 +/- 0,5                           | 2,3 +/- 1,2 | 1,5+/-0,7  | n.b.                |

<sup>1</sup> n=7 (Patienten 1- 7)

<sup>2</sup> n=5 (Patienten 1-4 und 6)

<sup>3</sup> n=2 (Patienten 5 und 7)

<sup>4</sup> Standardabweichung

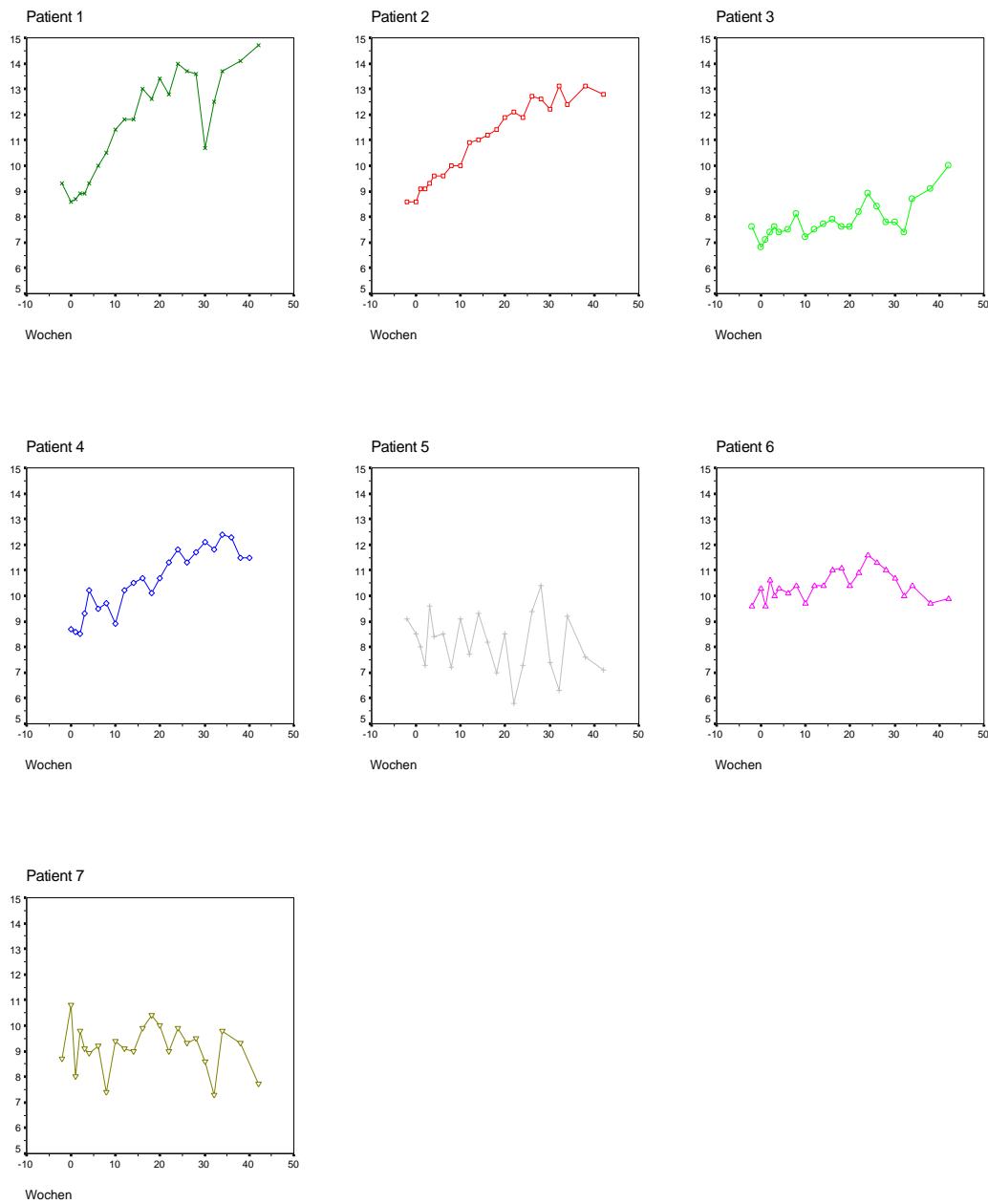
<sup>5</sup> Mittelwert

<sup>6</sup> p-Wert: asymptotische Signifikanz; 2-seitig; Wilcoxon Rangsummentest für zwei verbundene Stichproben; bezieht sich auf die Bilirubinwerte in Woche 0 und in Woche 34

## 4.8 Entwicklung der Hb-Werte unter Eculizumabtherapie

Der Hämoglobinwert wird zur Diagnostik und Verlaufskontrolle von Anämien bestimmt. Da die PNH zur Gruppe der hämolytischen Anämien zählt, wird der Hb-Wert von PNH-Patienten regelmäßig untersucht.

Der durchschnittliche Hb-Wert aller Patienten von 8,9 g/dl nach 8 Wochen Therapie zeigte bezogen auf den Ausgangswert von Woche 0 (8,9 g/dl) keine Änderung. In Woche 34 konnte eine statistisch signifikanter Anstieg des mittleren Hb-Wertes auf 11,1 g/dl beobachtet werden. Durchschnittlich stieg der Hb-Wert um 26,8 % nach 34 Wochen an. Die unter Antikörpertherapie nicht mit Erythrozytenkonzentraten transfundierten Patienten erzielten bereits nach 8 Wochen Therapie eine Zunahme des Hämoglobinwertes von 8,6 g/dl auf 9,6 g/dl. Dies entsprach einem durchschnittlichen Anstieg um 12,8 %. Nach 34 Wochen Therapie wurde in der gleichen Patientengruppe ein Hämoglobinmittelwert von 11,5 g/dl gemessen. Bezogen auf den Ausgangswert war der Hb-Wert zu diesem Zeitpunkt um 35,0 % angestiegen. Bei den beiden Studienpatienten, die unter Eculizumabtherapie weiterhin Erythrozytenkonzentrate erhielten, zeigte sich durchschnittlich nach 8 Wochen Therapie ein Abfall des untersuchten Parameters von 9,7 g/dl auf 7,3 g/dl, was einer relativen Abnahme um 23,4 % entspricht. Nach 34 Therapiewochen wurde im Vergleich zum Ausgangswert ein nur leichter Anstieg des Hämoglobinwertes um 6,5 % auf 10,1 g/dl gesehen.



**Abb. 15. Entwicklung der Hb-Werte unter Eculizumabtherapie.** Pat. 1-4 und 6 erhielten nach Therapieeinleitung keine Eks; Pat. 5 und 7 erhielten nach Therapieeinleitung weiterhin EKs.



**Tab. 18. Entwicklung der Hb-Werte unter Eculizumabtherapie**

|                                 | Hb-Wert (g/dl)                        |             |              | p-Wert <sup>6</sup> |
|---------------------------------|---------------------------------------|-------------|--------------|---------------------|
|                                 | Woche 0                               | Woche 8     | Woche 34     |                     |
| Alle Patienten <sup>1</sup>     | 8,9 <sup>4</sup> +/- 1,3 <sup>5</sup> | 8,9 +/- 1,4 | 11,1 +/-1,7  | 0,042               |
| Patienten ohne EKs <sup>2</sup> | 8,6 +/- 1,2                           | 9,6 +/- 1,0 | 11,5 +/-1,9  | 0,043               |
| Patienten mit EKs <sup>3</sup>  | 9,7 +/- 1,6                           | 7,3 +/- 0,1 | 10,1 +/- 0,4 | n.b.                |
| Patient 1                       | 8,6                                   | 10,5        | 13,7         |                     |
| Patient 2                       | 8,6                                   | 10,0        | 12,4         |                     |
| Patient 3                       | 6,8                                   | 8,1         | 8,7          |                     |
| Patient 4                       | 8,6                                   | 8,9         | 12,3         |                     |
| Patient 5                       | 8,5                                   | 7,2         | 9,2          |                     |
| Patient 6                       | 10,3                                  | 10,4        | 10,4         |                     |
| Patient 7                       | 10,8                                  | 7,4         | 9,8          |                     |

1 n=7 (Patienten 1-7)

2 n=5 (Patienten 1-,4 und 6)

3 n=2 (Patienten 5 und 7)

4 Mittelwert

5 Standardabweichung

6 p-Wert: asymptotische Signifikanz; 2-seitig; Wilcoxon Rangsummentest für zwei verbundene Stichproben; bezieht sich auf die Hb-Werte in Woche 0 und in Woche 34

**Tab. 19. Prozentuale Entwicklung der Hb-Werte unter Eculizumabtherapie**

|                                 | Anstieg des Hb-Wertes (%) |          |
|---------------------------------|---------------------------|----------|
|                                 | Woche 8                   | Woche 34 |
| Alle Patienten <sup>1</sup>     | 2,1                       | 26,8     |
| Patienten ohne EKs <sup>2</sup> | 12,8                      | 35,0     |
| Patienten mit EKs <sup>3</sup>  | -23,4                     | 6,5      |
| Patient 1                       | 22,1                      | 59,3     |
| Patient 2                       | 16,3                      | 43,6     |
| Patient 3                       | 19,1                      | 27,9     |
| Patient 4                       | 3,5                       | 43,0     |
| Patient 5                       | -15,3                     | 22,3     |
| Patient 6                       | 1,0                       | 1,0      |
| Patient 7                       | -31,5                     | -9,26    |

1 n=7 (Patienten 1-7)

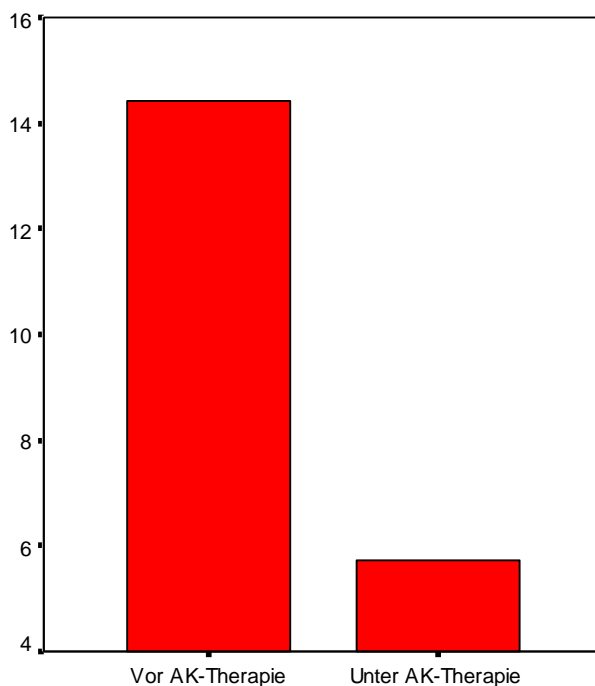
2 n=5 (Patienten 1-4 und 6)

3 n=2 (Patienten 5 und 7)

## 4.9 Entwicklung der Transfusionshäufigkeit unter Eculizumabtherapie

Die durchschnittliche Transfusionsrate im jeweiligen Jahr vor Therapieeinleitung betrug pro Patient 14,4 Einheiten. Bezogen auf das erste Jahr nach Therapieeinleitung belief sie sich auf durchschnittlich 5,7 Einheiten pro Patient. Somit konnte unter Eculizumabtherapie eine relative Reduktion der Transfusionshäufigkeit von 60,4 % erreicht werden.

Fünf der Studienteilnehmer (Pat.1, 2, 3, 4 und 6) benötigten während der Eculizumabtherapie keine Erythrozytenkonzentrate. Die Patienten 5 und 7 hingegen waren auch unter Antikörpertherapie weiterhin transfusionspflichtig. Bei Patient 7 kam es zwar zu einer Abnahme der Transfusionshäufigkeit um 53,3 %, jedoch zu keiner Transfusionsunabhängigkeit. Patient 5, der neben der PNH an einer AA erkrankt ist, zeigte während des Therapiezeitraums von einem Jahr eine Zunahme der Transfusionshäufigkeit um 76,9 %.



**Abb. 16. Durchschnittliche Transfusionsrate (EKs/Patient/Jahr) von sieben PNH-Patienten (Pat 1-7) während des Jahres vor und des ersten Jahres unter Eculizumabtherapie**

**Tab. 20. Transfusionshäufigkeit vor und unter Eculizumabtherapie**

|                             | Transfusionsrate (Einheiten / Patient / Jahr) |             |                           |             |
|-----------------------------|---|-------------|---------------------------|-------------|
|                             | vor Therapie (1 Jahr)                         |             | während Therapie (1 Jahr) |             |
|                             | / Jahr  | / Monat     | / Jahr                    | / Monat     |
| Alle Patienten <sup>1</sup> | 14,4 <sup>2</sup> +/- 12,5 <sup>3</sup>       | 0,5 +/- 0,4 | 5,7 +/- 10,3              | 0,2 +/- 0,3 |
| Patient 1                   | 10  | 0,33        | 0                         | 0           |
| Patient 2                   | 2   | 0,07        | 0                         | 0           |
| Patient 3                   | 2   | 0,07        | 0                         | 0           |
| Patient 4                   | 31  | 1,02        | 0                         | 0           |
| Patient 5                   | 6   | 0,2         | 26                        | 0.85        |
| Patient 6                   | 20  | 0,66        | 0                         | 0           |
| Patient 7                   | 30  | 0,99        | 14                        | 0,46        |

1 n=7 (Patienten 1-7)

2 Mittelwert

3 Standardabweichung

## 5 Diskussion

---

### 5.1 Entwicklung der GPI-defizienten Erythrozyten unter Eculizumabtherapie

Die Durchflusszytometrie ist die sensitivste und gleichzeitig informativste Methode zur Diagnostik und Verlaufsbeobachtung der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (Schubert et al., 1991; Hall et al., 1996; Richards et al., 2000; Richards et al., 2007a; Richards et al., 2007b). Eine genaue Messung der GPI-defizienten Blutzellen, insbesondere die der Erythrozyten und Granulozyten, ist für die Diagnosestellung einer PNH unverzichtbar. Die Untersuchung der GPI-defizienten Zellen hat einen Einfluss auf das Therapiemanagement jedes einzelnen Patienten. Insbesondere das sequentielle Monitoring des roten PNH-Klons spielt unter Therapie mit dem neuen PNH-Therapeutikum Eculizumab eine bedeutsame Rolle, da die GPI-defizienten Zellen durch die Antikörpergabe geschützt werden und anteilig ansteigen (Hill et al., 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir mithilfe durchflusszytometrischer Untersuchungen durchschnittlich eine Zunahme des GPI-defizienten Erythrozytenanteils der von uns beobachteten und mit Eculizumab behandelten sieben PNH-Patienten nachweisen. Statistische Signifikanz konnte aufgrund der geringen Fallzahl jedoch nicht erreicht werden. In einer im Jahr 2004 veröffentlichten Pilotstudie an 11 PNH-Patienten wurde ein statistisch signifikanter Anstieg der GPI-defizienten Erythrozyten unter Eculizumabtherapie beschrieben (Hillmen et al., 2004). Hier zeigte sich eine durchschnittliche Zunahme der Typ-III-Erythrozyten von 36,7 % auf 59,2 % ( $p=0,005$ ). Bei unseren Studienpatienten betrug der durchschnittliche Anteil an GPI-defizienten Erythrozyten vor Therapiebeginn 40,4 %, nach acht Wochen Eculizumabtherapie 59,6 % und nach 34 Wochen Eculizumabtherapie 52,3 % ( $p=0,345$ ). Ebenso zeigte sich bei der Auswertung der TRIUMPH-Studie, in die drei unserer Studienpatienten (Patienten 4, 6 und 7) eingebracht wurden, ein Anstieg der PNH-Erythrozyten unter Antikörpertherapie (Hillmen et al., 2006). Die Zunahme dieser Zellfraktion kann durch die Wirkungsweise des monoklonalen Antikörpers Eculizumab erklärt werden, der an den Faktor C5 des Komplementsystems bindet und so eine Blockade

der Komplementkaskade bewirkt (Kaplan 2002; Rother et al., 2007). Durch die Bindung an C5 verhindert Eculizumab die Entstehung des potenten Anaphylatoxins C5a und des Membranangriffkomplexes C5b-C9 (MAC), wodurch die GPI-defiziente Zellfraktion vor der Hämolyse geschützt wird und somit ansteigt. Die frühen Faktoren des Komplementsystems sind von der Hemmung nicht betroffen.

Trotz der mittleren Zunahme der GPI-defizienten Erythrozyten stellten wir bei einigen Patienten unter Antikörpertherapie eine weniger eindeutige Entwicklung dieser Zellfraktion fest. Die Fallzahl von sieben Patienten lässt nur eine eingeschränkte Aussagekraft der statistischen Auswertung zu, so dass hier, sowie auch in den folgenden Abschnitten dieser Arbeit, den Einzelfalldarstellungen eine besondere Bedeutung zukommt. Bei den unter Eculizumabtherapie mit Erythrozytenkonzentraten transfundierten Patienten (Patienten 5 und 7) wurden plötzliche Rückgänge der Typ-III-Erythrozyten beobachtet. Diese lassen sich teilweise auf eine Verdünnung der defizienten Zellen mit den transfundierten normalen Erythrozyten zurückführen (Hillmen et al., 2004). Aufgrund der fehlenden Verdünnung durch Spendererythrozyten wurde bei den unter Eculizumabtherapie nicht transfundierten Patienten eine größere Zunahme der defizienten Erythrozyten als bei den transfundierten Patienten beobachtet. Die unter Antikörpergabe nicht mit EKs transfundierten Patienten wiesen jedoch auch Schwankungen der GPI-defizienten Erythrozyten auf. Diese Beobachtung führt zu der Annahme, dass sich die fehlende Zunahme der CD59-negativen Erythrozyten bei den unter Eculizumabgabe mit EKs transfundierten Patienten 5 und 7 nicht ausschließlich auf eine Verdünnung durch Erythrozytenkonzentrate zurückführen lässt. Spiegelschwankungen von Eculizumab oder eine erhöhte Aktivität des Komplementsystems im Rahmen von Infekten könnten Ursache für den zeitweiligen Durchbruch der Hämolyse sein (Hillmen et al. 2004). Die Tatsache, dass trotz Blockade des terminalen Komplementsystems eine geringfügige Hämolyse mit Abfall der GPI-defizienten Erythrozyten erfolgte, könnte jedoch auch auf einen weiteren, vom terminalen Komplementsystem unabhängigen Hämolysemechanismus bei Patienten mit paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie hindeuten (Hillmen et al., 2004; Hill et al., 2005). Bei Patient 6 konnte ein direkter Coombs-Test mit polyspezifischem Antihumanserum und monospezifischem Anti-C3d als positiv bewertet werden. Dadurch konnten wir bei diesem Studienteilnehmer den Beweis für eine extravaskuläre Hämolyse der mit C3 opsonierten Erythrozyten erbringen. Hillmen et al. stellten die Hypothese auf, dass die residuelle Hämolyse, die sich durch weiterhin leicht erhöhte LDH-Werte bemerkbar macht,

entweder auf eine C3b vermittelte extravasale Hämolyse oder auf einen anderen, Komplement unabhängigen Mechanismus zurückzuführen sei (Hillmen et al., 2004). In einer Arbeit von Jasinski et al. wurde anhand eines Mausmodels ein alternativer, Komplement-unabhängiger Mechanismus beschrieben, der für den erhöhten Umsatz von GPI-defizienten roten Blutzellen verantwortlich sein soll (Jasinski et al., 2004). Die Forscher fanden heraus, dass durch wiederholte intravenöse Injektionen von mit Clodronat beladenen Liposomen, welche Makrophagen in der Milz, der Leber und evtl. auch im Knochenmark effektiv eliminieren, die Halbwertszeit von GPI-Anker-negativen roten Blutzellen in Mäusen verlängert werden konnte. Hieraus folgerte man, dass der erhöhte Zellumsatz durch in Milz, Leber und möglicherweise auch im Knochenmark ansässige Makrophagen verursacht wird. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Vermutung aufgestellt, dass ein ähnlicher Mechanismus auch die Halbwertszeit von PNH-Erythrozyten beim Menschen beeinflussen könnte. Darüber hinaus deutet der von Yonemura et al. veröffentlichte Fall eines PNH-Patienten mit hereditärem C9 Faktormangel, bei dem trotz des Mangels an C9 eine milde Hämolyse beobachtet werden konnte, auf einen zusätzlichen, vom terminalen Komplementsystem unabhängigen Hämolysemechanismus hin (Yonemura et al., 1990). Der Komplementfaktor C9 ist Teil des Membranangriffskomplexes (MAC), welcher bei PNH-Patienten für die intravasale Hämolyse verantwortlich gemacht wird (Rouault et al., 1978). Fehlt jedoch C9, kann der Membranangriffskomplex nicht gebildet werden, womit die Lyse der PNH-Erythrozyten unterbunden wird. In einer von Risitano veröffentlichten Arbeit aus dem Jahr 2009 konnte zudem gezeigt werden, dass die Behandlung mit Eculizumab mit der Bindung von C3 auf einer signifikanten Fraktion von roten PNH Zellen einhergeht, wodurch es zu einer Komplement-vermittelten extravasalen Hämolyse kommt.

Eine Sonderrolle bezogen auf die Entwicklung der PNH-Erythrozyten unter Eculizumabtherapie nimmt Patient 1 ein. In den ersten acht Wochen nach Therapiebeginn wurde ein Anstieg der CD59-negativen Erythrozyten von 16,3 auf 45,9 % beobachtet. Die Zunahme der GPI-defizienten Erythrozyten lässt sich durch die Unterdrückung der intravasalen Hämolyse durch den anti-C5-Antikörper erklären. Nach 16 Wochen Eculizumabtherapie kam es erneut zu einem Abfall der defizienten Erythrozytenfraktion bis auf ein Minimum von 26,0 % in Woche 34. Während des Beobachtungszeitraums wurde trotz Fortführung der Therapie mit Eculizumab kein erneuter Anstieg der defizienten Zellfraktion verzeichnet. Eine insuffiziente Hemmung des Komplementsystems, die beispielsweise durch

erniedrigte Plasmaspiegel von Eculizumab oder durch Infektionen hervorgerufen werden kann, erscheint aufgrund weitestgehend unveränderter Laktatdehydrogenasewerte nicht wahrscheinlich. Da der Patient unter Antikörpertherapie nicht transfusionspflichtig war, kann eine Verdünnung durch Erythrozytenkonzentrate nicht ursächlich für den Rückgang des GPI-defizienten Klons sein. Eine mögliche Erklärung für die Abnahme der defizienten Erythrozytenpopulation ist die Reduktion des GPI-defizienten Klons im Sinne einer spontanen Remission der PNH, die in der Literatur wiederholt beschrieben worden ist. Maßgeblich ist hier jedoch der Anteil der GPI-defizienten Granulozyten, der mit der Größe des GPI-defizienten Klons am besten korreliert und am Ende des Beobachtungszeitraums ebenfalls rückläufig war, was für eine spontane Remission sprechen könnte (Brubaker et al., 1977). Im Rahmen einer retrospektiven Beobachtungsstudie an 80 PNH-Patienten wurden bei 15 % der analysierten Studienteilnehmer etwa 10-20 Jahre nach Diagnosestellung Langzeitremissionen festgestellt (Hillmen et al., 1995). Bei den betroffenen Patienten wurden nach der Genesung im peripheren Blut lediglich noch einige defiziente Lymphozyten, jedoch keinerlei defiziente Erythrozyten oder Neutrophile gefunden. Eine mögliche Erklärung für eine spontane Remission ist, dass PNH-Klone eine endliche Lebenserwartung wie somatische Zellen haben, so dass die Genesung letztlich von dem Vorhandensein normaler Zellen, die das Knochenmark erneut besiedeln können, abhängt (Dacie; 1980). Grundsätzlich ist eine Remission der PNH bei unserem Patienten möglich, jedoch nicht gesichert, da wir zwar über einen längeren Zeitraum eine Abnahme der GPI-defizienten Erythrozyten, aber wie bereits oben erwähnt nur am Ende des Beobachtungszeitraums eine Abnahme der GPI-defizienten Granulozyten beobachten konnten (s. 4.2). Ob eine vollständige Verdrängung der GPI-defizienten Populationen bei diesem Patienten erzielt werden wird, wird der weitere Verlauf zeigen. Eine andere mögliche Erklärung für den Rückgang der Typ-III-Erythrozyten, jedoch nicht für den der GPI-defizienten Granulozyten, könnte eine extravasal stattfindende Hämolyse sein (s.o.). Auch hier könnte ein Coombs-Test weitere wichtige Informationen liefern. Die deutlich rückläufigen LDH-Werte sprechen jedoch gegen eine ausgeprägte Hämolyse. Die persistierende Retikulozytose des Patienten ist sowohl mit einer intra-, als auch mit einer extravasalen Hämolyse vereinbar, so dass diese nicht als Unterscheidungskriterium für den Ort der Hämolyse dient. Bei extravaskulären Formen der Hämolyse wird typischerweise ein Anstieg der Bilirubinabbauprodukte im Faeces und Urin sowie ein Anstieg des konjugierten Bilirubins im Plasma beschrieben. Die bei dem Patienten persistierende Hyperbilirubinämie ist somit mit einer extravasalen Hämolyse vereinbar. Ein

Hinweis auf den Destruktionsort könnte auch eine Bestimmung des Haptoglobins erbringen. Bei intravasalen Hämolysen kommt es zu einer Erniedrigung des Haptoglobins, wohingegen bei extravasalen Hämolysen nur bei ausgeprägten Formen erniedrigte Haptoglobinwerte zu erwarten sind. Hämoglobinämie, Hämosiderinurie, Methämoglobinämie und Hämoglobinurie treten bei intravasalen, jedoch nicht bei extravaskulären hämolytischen Anämien auf, so dass diese bei der Unterscheidung zwischen den beiden genannten Hämolyseformen hätten zu Rate gezogen werden können. (Rother et al., 2005; Schubert et al.; 2009).

Ebenfalls diskussionswürdig ist die Entwicklung der GPI-defizienten Erythrozyten von Patient 5. Vor Therapiebeginn wurde ein hoher Anteil an CD59-negativen Erythrozyten von >70 % gemessen. Nach Therapieeinleitung kam es nicht wie erwartet zu einer weiteren Zunahme der defizienten Zellfraktion, sondern zu einem deutlichen Rückgang unterhalb des Ausgangsniveaus von Woche 0. Da der Patient unter Antikörpertherapie weiterhin substitutionspflichtig war und der Ausgangswert der CD 59-negativen Erythrozyten vor Transfusion der CD59-positiven Erythrozytenkonzentrate bestimmt wurde, kann eine Verdünnung durch Erythrozytenkonzentrate teilweise als Erklärung für den Rückgang der Zellfraktion dienen. Es gilt als erwiesen, dass die pharmakodynamische Aktivität direkt mit der Serumkonzentrationen von Eculizumab korreliert, die Aufrechterhaltung von Talspiegeln  $\geq 35 \mu\text{g}$  zu einer vollständigen Blockade der hämolytischen Aktivität führt und es bei Talspiegeln unter  $35 \mu\text{g}$  zu einer erneuten hämolytischen Aktivität kommt (Hillmen et al., 2004). Aufgrund dieser pharmakodynamischen Kenntnisse kann auch bei unserem Patienten die unzureichende Hemmung des Komplementsystems mit Rückgang der defizienten Erythrozytenfraktion durch zu niedrige Serumkonzentrationen von Eculizumab erklärt werden. Ebenso kann es im Rahmen von Infektionen zu einer Druchbruchhämolyse kommen. Die Tatsache, dass in diesem Zusammenhang kein massiver Anstieg der LDH (s. 4.7) beobachtet wurde, machen die zuletzt genannten Erklärungsversuche für den Rückgang der defizienten Erythrozyten jedoch unwahrscheinlich. Eine parallel ablaufende extravasale Hämolyse kann mitverantwortlich für den Rückzug der GPI-defizienten Erythrozytenfraktion gewesen sein. Die persistierende Hyperbilirubinämie des Patienten ist mit dieser These vereinbar, beweist sie jedoch nicht. Ein Coombs-Test hätte auch hier der Unterscheidung zwischen intra- und extravasaler Hämolyse dienen können. Eine Langzeitremission ist unwahrscheinlich, da bei der GPI-defizienten Granulozytenfraktion des gleichen Patienten (s.4.2), welche die Größe der GPI-defizienten Vorläuferzellen widerspiegelt, nur am Ende des



Beobachtungszeitraums ein Rückgang zu verzeichnen war (Piedras et al., 2000). Zudem wurde zeitgleich kein Rückgang der GPI-defizienten Retikulozyten gesehen, was gegen eine Spontanremission und für eine Hämolyse spricht. Aus welchem Grund sich der defiziente Klon so weit zurückgezogen hat, ist nicht bekannt.

## **5.2 Entwicklung der GPI-defizienten Granulozyten unter Eculizumabtherapie**

Unsere durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigen durchschnittlich keine signifikante Änderung der GPI-defizienten Granulozytenanteile unter Eculizumabtherapie ( $p=0,173$ ). Diese Beobachtung wurde bereits von Hillmen et al. im Jahre 2004 publiziert und bestätigte sich erneut in der TRIUMPH-Studie (Hillmen et al., 2004; Hillmen et al., 2006). Die Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen validiert unsere Untersuchungen. Lediglich bei den Patienten 1 und 5 beobachteten wir am Ende des Untersuchungszeitraums einen Abfall der GPI-defizienten Granulozyten. Da wir den weiteren Verlauf dieser Zellen jedoch nicht kennen, kann nicht unterschieden werden, ob es sich nur um einen einfachen Ausreißer oder um eine längerfristige Entwicklung handelt. Falls man in Zukunft bei den o.g. Patienten eine weitere Abnahme dieses Parameters beobachten würde, könnte dies ein Hinweis für eine Remission der PNH sein (s. 5.1) (Hillmen et al., 1995).

Granulozyten gehören zu den kernhaltigen Zellen des Blutzellsystems. Kernhaltige Zellen, bei denen eine GPI-Defizienz nachzuweisen ist, sind vor der intravaskulären Zytolyse geschützt. Dies liegt daran, dass sie das membrane-cofactor-protein (MCP), auch CD46 genannt, exprimieren. Dieses hindert die alternative Komplementkaskade daran, sich dauerhaft und unreguliert an der Oberfläche dieser Zellen zu aktivieren (Seya et al., 1988). Da die Granulozyten nicht von der Zytolyse betroffen sind und zudem nicht von den Leukozyten depletierten Erythrozytenkonzentraten beeinflusst werden, liefert die Größe ihrer Fraktion die genaueste Abschätzung über den Anteil an der PNH-Hämatopoese (Rosse et al., 2004). Die alternative Komplementkaskade wird durch die genannten Oberflächenproteine auch ohne Antikörpertherapie gehemmt, so dass die Eculizumabtherapie keinerlei Auswirkungen auf die ohnehin schon hohen Anteile ( $>70\%$ ) an GPI-defizienten Granulozyten hat. Diese Hypothese können wir durch unsere Untersuchungsergebnisse als bestätigt ansehen.

### **5.3 Entwicklung der GPI-defizienten Erythrozyten im Vergleich zur Entwicklung der GPI-defizienten Granulozyten unter Eculizumabtherapie**

Der Vergleich der GPI-defizienten Erythrozyten und Granulozyten am Beispiel eines unter Eculizumabtherapie transfusionspflichtigen und eines nicht transfusionspflichtigen PNH-Patienten verdeutlicht, dass die Entwicklung der GPI-defizienten Granulozyten und Erythrozyten unabhängig voneinander verläuft. Bei beiden Patienten kam es zu keiner wesentlichen Änderung des GPI-defizienten Granulozytenklons, was für den Schutz der kernhaltigen Zellen durch das transmembran verankerte Oberflächenprotein (CD 46) vor der Hämolyse durch das Komplementsystem spricht. Bei dem unter Eculizumabtherapie transfusionspflichtigen Patienten 4 wurde erwartungsgemäß durch die weitestgehende Unterbindung der Hämolyse ein Anstieg des defizienten Erythrozytenklons beobachtet. Bei Patient 5, der trotz Hemmung des Komplementsystems durch den anti-C5-Antikörper weiterhin transfusionspflichtig ist, kam es durch die Transfusion mit Erythrozytenkonzentraten und einer mutmaßlich weiterhin bestehenden intra- und extravasalen Hämolyse zu einem Rückgang des GPI-defizienten Erythrozytenklons (s. 5.1).

### **5.4 Entwicklung der GPI-defizienten Retikulozyten unter Eculizumabtherapie**

Bei den GPI-defizienten Retikulozyten konnten wir ähnlich wie bei den GPI-defizienten Granulozyten keine relative Zunahme unter Eculizumabtherapie feststellen. Während des Untersuchungszeitraums waren trotz einer fehlenden Zunahme der PNH-Retikulozyten unter Eculizumabtherapie insgesamt deutlich höhere Prozentwerte an defizienten Retikulozyten als an defizienten Erythrozyten zu finden. Die Ausgangswerte der GPI-defizienten Retikulozyten lagen durchschnittlich nur leicht unter denen der GPI-defizienten Granulozyten. Retikulozyten mit einem GPI-Ankerdefekt sind als kernlose Zellen, denen das transmembran verankerte Oberflächenprotein (CD46) fehlt, ebenfalls von der Komplement-induzierten Hämolyse betroffen. Bisher waren sie jedoch relativ selten Gegenstand der PNH-Forschung.

Iwamoto et al. konnten mit einer Studie an zwölf PNH-Patienten und fünf gesunden Probanden zeigen, dass Retikulozyten und Granulozyten unter Komplement-induzierter

Zytolyse vergleichbar große Populationen an GPI-defizienten Zellen aufwiesen (Iwamoto et al., 1995). Bei allen untersuchten Patienten wurden kleinere Populationen an GPI-defizienten Erythrozyten als an GPI-defizienten Retikulozyten gefunden. Der von dem Defekt betroffene Retikulozytenanteil blieb trotz hämolytischer Krisen und Bluttransfusionen unverändert hoch, wohingegen der Anteil an GPI-defizienten Erythrozyten sank. Diese Forschungsergebnisse werden von früheren Berichten unterstützt, welche besagen, dass Retikulozyten bei der PNH zu einem großen Anteil von dem Defekt betroffen sind (Fujioka et al., 1992), eine geringe Aktivität des GPI-verankerten Membranproteins Acetylcholinesterase und eine merkliche Komplementsensitivität aufweisen (Metz et al. 1960; Auditore et al., 1959). Man vermutete, dass die trotz Zytolyse großen Populationen an betroffenen Retikulozyten möglicherweise durch eine Anämie induzierte „feedback Stimulation“ der Erythropoese bei PNH mit konsekutiver relativer Retikulozytose erklärt werden können. Die Forscher schlussfolgerten, dass Retikulozyten aufgrund ihrer kurzen Lebenszeit von vier Tagen, die mit dem Übergang in einen Erythrozyten endet, weniger abhängig von der Hämolysen sind als Erythrozyten mit einer Lebenszeit von durchschnittlich 120 Tagen. Aus diesem Grund geht man davon aus, dass Retikulozyten zuverlässige Marker für die Quantifizierung der Erythropoese durch die PNH-Stammzellen sind. Zu einem vergleichbaren Ergebnis kam auch eine andere Forschergruppe, die einen ähnlich großen Anteil an defizienten Retikulozyten und Granulozyten bei PNH-Patienten fand und darin einen Beweis für gleiche Proliferationsraten der erythroiden und neutrophilen Blutzellreihen bei PNH sah (Ware et al., 1995). Sato et al. vermuteten, dass CD59-negative Retikulozyten sensitive Marker für die Quantifizierung der von der PNH betroffenen Erythropoese sein könnten (Sato et al., 2006). Eine andere Forschergruppe sah in der zeitweiligen Dominanz der GPI-defizienten Retikulozyten im peripheren Blut ein Zeichen erhöhter Knochenmarkaktivität (Pakdeesuwan et al., 2001). Ihre Messungen wiesen ähnlich wie unsere insgesamt höhere prozentuale Anteile an GPI-defizienten Retikulozyten als an GPI-defizienten Erythrozyten und noch höhere Anteile an GPI-defizienten Granulozyten nach. Die Diskrepanzen in der Expression GPI-verankerter Proteine zwischen den Zelllinien sind wahrscheinlich Folge der verschiedenen Lebenszeitspannen und des unterschiedlichen Einflusses der Komplement-induzierten Zytolyse.

Die in der Literatur beschriebenen Beobachtungen über die hohen Anteile an GPI-defizienten Retikulozyten konnten wir mithilfe der vor Therapieeinleitung durchgeführten

durchflusszytometrischen Analysen bestätigen. Untersuchungen über die Entwicklung der GPI-Anker negativen Retikulozytenfraktion unter Eculizumabtherapie wurden, soweit uns bekannt ist, hier erstmalig durchgeführt. Die Tatsache, dass es unter Eculizumabtherapie zu keinem eindeutigen Anstieg des ohnehin schon hohen Anteils an GPI-defizienten Retikulozyten kam, unterstützt die Hypothese, dass die GPI-defizienten Retikulozyten nicht wesentlich durch die Hämolysen und damit auch nicht durch die Hemmung der intravasalen Hämolysen mit Eculizumab beeinflusst werden. Ob die kurze Lebensdauer der Retikulozyten einen Schutz vor der Hämolysen durch das Komplementsystem bietet, der hohe Anteil an GPI-defizienten Retikulozyten allein durch eine reaktive Retikulozytose erklärt werden kann oder ob noch andere Mechanismen für den Schutz der GPI-defizienten Retikulozyten verantwortlich sind, muss Gegenstand weiterer Studien mit größerer Fallzahl sein.

## **5.5 Entwicklung der absoluten Retikulozytenwerte unter Eculizumabtherapie**

Retikulozyten werden bei der Diagnosestellung und zur Verlaufskontrolle der PNH bestimmt, da sie als Maß für die Hämatopoese eine Aussage über die Knochenmarkreserve treffen und bei hämolytischen Anämien reaktiv erhöht sind (Schubert et al., 2009).

Weder in der Gruppe der transfundierten, noch in der der nicht mit EKs transfundierten PNH-Patienten konnten wir unter Antikörpertherapie einen zum Ausgangswert signifikanten Unterschied der durchschnittlich deutlich über dem Referenzwert liegenden absoluten Retikulozytenwerte beobachten. Lediglich bei Patient 5 stellten wir eine deutliche Abnahme der absoluten Retikulozyten fest, die sich durch eine progredienten Knochenmarkinsuffizienz bei einer neben der PNH bestehenden aplastischen Anämie erklären lässt.

Im Jahr 2004 wurden bei einer Untersuchung an 11 PNH-Patienten ebenfalls weitestgehend unveränderte Retikulozytenwerte unter Gabe von Eculizumab nachgewiesen (Hillmen et al., 2004, Hill et al., 2005). Bei gleichem Therapieregime wurden konstante Retikulozytenwerte auch bei den Patienten der TRIUMPH-Studie gemessen (Hill et al. 2005; Hillmen et al. 2006). Eine von Pakdeesuwan et al. publizierte Untersuchung an PNH-Patienten mit ausreichender Knochenmarkreserve zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen den absoluten

Retikulozytenwerten und der Größe der defizienten Retikulozytenfraktion ( $p < 0,05$ ) (Pakdeesuwan et al., 2001). Auch bei unseren unter Therapie mit Eculizumab stehenden PNH-Patienten zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den absoluten Retikulozytenwerten und der Größe des GPI-defizienten Retikulozytenklons ( $p < 0,05$ ). Diese Untersuchungsergebnisse untermauern den positiven Effekt des anämischen Stresses auf die erythropoetische Aktivität und sprechen für einen dominanten Status des PNH-Klons. Die von uns beobachtete persistierende Retikulozytose unter Eculizumabtherapie könnte entgegen der bisherigen Vermutungen jedoch auch dafür sprechen, dass die Retikulozytose nicht ausschließlich „feedback“ stimuliert ist, da ansonsten ein Rückgang der Retikulozyten zu erwarten wäre. Dass trotz der regredienten Anämie mit vermeintlicher Abnahme des anämischen Stresses auf die erythropoetische Aktivität kein Rückgang der reaktiven Retikulozytose beobachtet werden konnte, lässt sich möglicherweise durch eine parallel ablaufende extravasale Hämolyse erklären, erfordert jedoch eine weitergehende Untersuchung.

## 5.6 Entwicklung der LDH-Werte unter Eculizumabtherapie

Bereits nach einmaliger Gabe von Eculizumab konnten wir bei allen beobachteten PNH-Patienten einen Rückgang des weit über der Norm liegenden Hämolyseparameters Laktatdehydrogenase beobachten ( $p < 0,05$ ). Die Laktatdehydrogenase fiel nach zwei Wochen Therapie von durchschnittlich 1968 U/l auf nur noch leicht über dem Referenzwert liegende Werte ab. Lediglich bei einem Patienten (Pat.1) wurde ein vorübergehender leichter Anstieg der LDH gesehen. Anhand dieser Ergebnisse konnten wir den hemmenden Einfluss von Eculizumab auf die intravasale Hämolyse bestätigen.

Die von uns beobachteten, weiterhin leicht erhöhten LDH-Werte sprechen jedoch gegen eine vollständige Unterbindung der Hämolyse. Ähnliche Beobachtungen wurden sowohl bei der Eculizumab-Pilotstudie (Hillmen et al., 2004; Rosse et al., 2004) als auch bei der Auswertung der TRIUMPH-Studie gemacht (Hillmen et al., 2006). Der vorübergehende Anstieg des LDH-Spiegels fiel bei den Teilnehmern beider Studien mit einem Durchbruch der Komplement-aktivierten Lyse zusammen. Nachdem der Eculizumabspiegel erneut angehoben und so die Komplementblockade stabilisiert werden konnte, kam es zu einem Rückgang der LDH. Neben Spiegelschwangungen von Eculizumab können Infektionen zu einer

Durchbruchhämolyse führen und somit für einen passageren Anstieg der Laktatdehydrogenase verantwortlich gemacht werden. Die leicht erhöhten LDH-Werte während Eculizumabtherapie könnten daneben auf eine persistierende und möglicherweise auch zunehmende C3b vermittelte extravasale Hämolyse unter Antikörpertherapie oder auf einen anderen, bisher unbekannten und vom Komplementsystem unabhängigen Hämolysemechanismus zurückzuführen sein (siehe Abschnitte 5.1, 5.5) (Hillmen et al., 2004; Risitano et al., 2009). Ein Coombs-Test könnte dem Nachweis einer extravasalen Hämolyse dienen (siehe 5.6).

## 5.7 Entwicklung des Gesamtbilirubins unter Eculizumabtherapie

Die PNH ist durch eine intravasale Hämolyse gekennzeichnet, die zum größten Teil zu einer Hämoglobinurie und nur zu einem sehr geringen Teil zu einem vermehrten Abbau von Hämoglobin zu Bilirubin führt. Ein prähepatischer Ikterus entsteht, wenn die Glucuronidierungskapazität der Leber überschritten wird und ist v.a. ein Zeichen des Abbaus von Hämoglobin zu Bilirubin über Makrophagen, also ein Zeichen der extravasalen Hämolyse. Obwohl bei der PNH die intravasale Hämolyse im Vordergrund steht, wird bei PNH-Patienten häufig ein Anstieg des Bilirubins mit dem klinischen Bild eines Ikterus beobachtet.

Die Bilirubinwerte der meisten hier beobachteten PNH-Patienten waren sowohl vor Therapiebeginn als auch unter Eculizumabtherapie erhöht. Lediglich bei zwei Studienpatienten (Pat. 1 und 5) wurden vor und unter Therapie normwertige oder nur leicht über der Norm liegende, weitestgehend stabile Bilirubinwerte beobachtet. Die übrigen Studienteilnehmer wiesen im Verlauf zum Teil erhebliche Schwankungen des Bilirubins mit Spitzenwerten von  $> 5$  mg/dl auf. Erhöhte Bilirubinwerte vor und fehlende signifikanten Änderungen unter Eculizumabtherapie wurden bereits in der Literatur beschrieben (Hillmen et al., 2004; Hill et al., 2005). Die Beobachtung, dass es trotz Hemmung des terminalen Komplementsystems mit damit einhergehender Unterbindung der intravasalen Hämolyse zu keinem Rückgang des Bilirubins kam, könnte ein Hinweis für eine Hochregulation der extravasalen Hämolyse durch das retikuloendotheliale System der von C3b opsonierten GPI-defizienten Erythrozyten unter Eculizumabtherapie sein (Risitano et al., 2009).

Die extravasale Hämolyse findet vornehmlich in der Milz statt und führt zu einem Anstieg des indirekten Bilirubins mit Ausscheidung über die Leber. Ob eine Splenektomie bei gleichzeitiger Komplementinhibition eine Normalisierung der Bilirubinwerte und einen Stillstand der Hämolyse bewirken kann, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Dieser Fragestellung wurde in einem Tiermodell nachgegangen. In einer von Jasinski et al. publizierten Untersuchung zeigte sich, dass der Abbau erythroider Blutzellen von GPI-defizienten Mäusen vornehmlich in der Milz stattfindet. Dennoch hatte die Splenektomie bei Mäusen keinen Einfluss auf die Halbwertszeit der GPI-Anker-negativen roten Blutzellen (Jasiniski et al., Blood 2004). Jedoch konnte, wie bereits in Abschnitt 5.1 erwähnt, durch Eliminierung der Makrophagen aus Milz, Leber und Knochenmark eine Wiederherstellung der genetisch determinierten Lebenszeit der betroffenen Blutkörperchen erreicht werden. Warum dennoch die Splenektomie, die einen Einfluss auf die Makrophagenaktivität haben müsste, keinen Nutzen brachte, ist nicht bekannt.

## **5.8 Entwicklung der Hb-Werte unter Eculizumabtherapie**

Der Hämoglobinwert bei PNH-Patienten lässt Rückschlüsse über den Grad der Hämolyse und die Regenerationsfähigkeit des Knochenmarks zu. Wie groß jedoch der jeweilige Beitrag dieser Faktoren zur Ausprägung der Anämie ist, kann letztlich nur gemutmaßt werden.

Unsere Studienteilnehmer erzielten nach 34 Wochen Antikörpertherapie eine signifikante Änderung des Hb-Wertes mit einem Anstieg von durchschnittlich 8,9 auf 11,1 g/dl ( $p=0,04$ ). Das entspricht einer relativen Zunahme um 26,8 %. In der Gruppe der Studienpatienten, die unter Antikörpertherapie keine Bluttransfusionen benötigte, wurde eine statistisch signifikante Zunahme des Parameters um 35,0 % erreicht ( $p=0,04$ ). Bei den transfundierten Patienten (Pat. 5 und 7) wurde zunächst eine Abnahme des Hb-Wertes auf 7,3 g/dl in Woche 8 und dann zu einer Zunahme auf 10,1 g/dl in Woche 34 beobachtet. Hätten diese Patienten keine Bluttransfusionen erhalten, wären noch niedrigere Hämoglobinwerte erwartet worden. Patient 5 leidet an einer fortschreitenden aplastischen Anämie, die für die Abnahme des Hb-Wertes mitverantwortlich gemacht werden kann. Auch bei den übrigen Patienten gehen wir davon aus, dass eine unzureichende Knochenmarkreserve einer vollständigen Normalisierung des Parameters entgegenwirkte. Die Tatsache, dass es bei den Studienteilnehmern unter

Eculizumabtherapie zu einem signifikanten Anstieg des Hämoglobinwertes kam und so eine Verbesserung der Anämiesymptomatik erzielt werden konnte, spricht für einen Rückgang der Hämolyse und kann als Erfolg für die Eculizumabtherapie gewertet werden. Sowohl in der Eculizumabpilotstudie aus dem Jahr 2004 als auch in der TRIUMPH- und in der SHEPHERD-Studie zeigte sich, dass mit Eculizumab behandelte Patienten im Vergleich zu mit Placebo behandelten Patienten, bzw. verglichen zum Ausgangswert, signifikant höhere Hb-Werte hatten ( $p < 0,001$ ; Hillmen et al. 2004; Schubert et al. 2008; Parker 2009). Die Tatsache, dass jedoch keine Normalisierung des Hb-Wertes erreicht wurde, kann für eine parallel ablaufende extravasale Hämolyse oder eine nur unvollständige Hemmung des Komplementsystems sprechen (s.o).

## **5.9 Entwicklung der Transfusionshäufigkeit unter Eculizumabtherapie**

Alle hier untersuchten PNH-Patienten waren vor Studienbeginn transfusionsbedürftig. Fünf dieser Studienteilnehmer benötigten unter Eculizumabtherapie keine Bluttransfusionen. Die beiden Übrigen (Pat. 5 und 7) waren trotz Antikörpergabe weiterhin transfusionspflichtig. Patient 5 wies sogar eine Zunahme der Transfusionsrate auf, die sich a.e. durch ein Fortschreiten der aplastischen Anämie erklären lässt. Die durchschnittliche Transfusionsrate ging von 0,5 Transfusionen pro Monat im Jahr vor Therapieeinleitung auf durchschnittlich 0,2 Transfusionen pro Monat im ersten Jahr nach Therapiebeginn zurück. Sie konnte somit um mehr als 50 % gesenkt werden konnte. In der Eculizumab-Pilotstudie von 2004 wurde eine Reduktion der monatlichen Transfusionshäufigkeit von durchschnittlich 2,1 Transfusionen im Jahr vor Therapie auf durchschnittlich 0,6 Transfusionen nach drei Monaten Antikörpertherapie erreicht (Hillmen et al., 2004). Da die Transfusionsrate abhängig vom Hämoglobinwert ist, ist sie ein indirektes Maß für die Hämolyseaktivität und die Knochenmarkreserve der PNH-Patienten.

## **5.10 Schlussfolgerungen**

Durch die Gabe des monoklonalen Antikörpers Eculizumab kommt es zu einer Hemmung des Komplementsystems. Dadurch wird die intravasale Hämolyse der kernlosen GPI-defizienten Zellen unterbunden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir bei PNH-Patienten mithilfe



durchflusszytometrischer Untersuchungen eine Zunahme des GPI-defizienten Erythrozytenanteils unter Eculizumabtherapie nachweisen. Statistische Signifikanz wurde aufgrund einer Fallzahl von sieben Patienten nicht erreicht. Die GPI-defizienten Retikulozyten sind ebenfalls von der Hämolyse durch das Komplementsystem betroffen, werden jedoch aufgrund ihrer kurzen Lebensdauer durch die intravasale Hämolyse und somit durch Eculizumab nicht wesentlich beeinflusst. Der bei unseren Patienten beobachtete signifikante Rückgang der LDH, der Anstieg des Hb-Wertes und die bei fünf von sieben Patienten erreichte Transfusionsfreiheit sind auf die Hemmung der intravasalen Hämolyse zurückzuführen. Die gleichzeitig persistierende Hyperbilirubinämie und Retikulozytose sind mit einer parallel ablaufenden extravasalen Hämolyse oder einem anderen, bisher unbekannten Hämolysemechanismus vereinbar. Der positive direkte Coombs-Test eines Studienpatienten wies eine extravasale Hämolyse nach.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass die extravasale Hämolyse eine Rolle bei der PNH spielt und geben einen Hinweis darauf, dass diese möglicherweise durch die Gabe von Eculizumab verstärkt wird. Wie genau es unter anti-C5-Antikörpergabe zu einer Zunahme der extravasalen Hämolyse bei PNH-Patienten kommt, ist noch unzureichend untersucht, so dass dieser Problematik in weiteren Untersuchungen nachgegangen werden sollte. Mit der Zulassung von Eculizumab in der EU im Jahr 2007 wurde die erste spezifische PNH-Therapie verfügbar. Obwohl hierdurch ein großer Benefit für Patienten mit paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie erbracht wurde, gibt die persistierende extravasale Hämolyse Anlass, die PNH-Therapie weiter zu optimieren.

## 5.11 Perspektiven

Die Zulassungsstudien von Eculizumab, TRIUMPH und SHEPHERD, haben gezeigt, dass intravasale Hämolyse und Hämoglobinurie bei PNH-Patienten unter Eculizumab fast vollständig unterbunden werden, so dass bei ca. 50 % der untersuchten PNH-Patienten eine Stabilisierung der Hämoglobinwerte und eine Transfusionsunabhängigkeit erreicht werden konnte (Hillmen et al., 2006; Schubert et al., 2008; Brodsky et al., 2008). Daneben können durch die Gabe des anti-C5-Antikörpers Muskeldystonie, thromboembolisches Risiko sowie klinische Zeichen eines pulmonalen Hypertonus und einer Niereninsuffizienz signifikant reduziert werden. (Hill et al., 2005 b; Hillmen et al., 2007; Hill et al., 2010; Hillmen et al.,

2010). Langzeitergebnisse über die positiven Effekte des Antikörpers sowie Daten über den Einfluss auf die Mortalität der Erkrankung liegen jedoch noch nicht vor, so dass hier eine weitere Beobachtung erforderlich ist. Die Rate der akut auftretenden, unerwünschten Nebenwirkungen ist gering (Hillmen et al., 2004); bisher ist jedoch nichts über die längerfristigen negativen Folgen der Komplementinhibition bekannt. Der Einsatz von Eculizumab für Schwangere scheint sicher zu sein (Kelly et al., 2010), ist jedoch noch nicht ausreichend erprobt. Bisher wurde gebärfähigen PNH-Patientinnen häufig von einer Schwangerschaft abgeraten. Eculizumab könnte dies ändern, sofern sich das Medikament weiterhin als sicher für Schwangere erweisen sollte.

Mit Eculizumab steht durch die Hemmung des Komplementsystems und der damit verbundenen Unterbindung der Zytolyse der kernlosen Blutzellen eine effektive, symptomatische Therapie der PNH zur Verfügung. Eine kausale Therapie der Erkrankung mit einem kurativen Ansatz ist bisher nicht etabliert. Genterapeutische Ansätze sind in Erprobung, stehen jedoch bisher nicht zur Verfügung (Rosse et al., 2004). Eine Stammzelltransplantation wird aufgrund einer zu hohen Mortalitätsrate nur in Einzelfällen und bei einer gleichzeitig bestehenden schweren aplastischen Anämie durchgeführt (Bemba et al., 1999; Saso et al., 1999). Der Ersatz eines künstlichen Glykolipidankers sowie der von gelöstem CD59 sind experimentelle Therapieverfahren, die jedoch aufgrund mangelnder Effektivität keinen Eingang in die PNH-Therapie gefunden haben (Rother et al., 1994; Sah et al. 2004). Die Therapie der extravasalen Hämolyse stellt insbesondere in der Eculizumab-Ära eine große Herausforderung dar. Derzeit ist jedoch unklar, wie die extravasale Hämolyse therapiert werden kann und inwiefern unter Eculizumabtherapie stehende PNH-Patienten hiervon profitieren könnten. Ein Nachteil der Eculizumabtherapie ist, dass eine hohe Compliance der Patienten erforderlich ist, da in der Regel alle zwei Wochen eine intravenöse Applikation erforderlich ist. Ein Therapieabbruch kann zu einer verstärkten Hämolyse führen und ein Wiederaufflammen der Symptomatik hervorrufen. Nachteilig ist zudem, dass aktuell sehr hohe Kosten mit der Antikörpergabe verbunden sind.

Aufgrund des Wirkmechanismus, der Hemmung der terminalen Komplementsystems, befindet sich Eculizumab auch bei inflammatorischen Erkrankungen, bei denen es zu einer Überstimulation des Komplementsystems kommt, in Erprobung. So haben Untersuchungen gezeigt, dass der Komplementinhibitor bei Patienten mit einem atypischen hämolytischen

Syndrom erfolgreich eingesetzt werden konnte, da es hier zu einer Überstimulation des Komplementsystems kommt (Kavanagh et al., 2010). Mögliche andere Einsatzgebiete von Eculizumab sind u.a. die rheumatoide Arthritis, der systemische Lupus erythematoses, die membranoproliferative Glomerulonephritis Typ II (Dense Deposit Disease, MPGN II) und möglicherweise auch das Guillain-Barré-Syndrom (Kaplan M. 2002; Smith et al., 2007; Robak et al., 2009; van Doorn., 2009). Hier liegen jedoch bisher keine randomisierten Studien vor. Ein breiterer Einsatz von Eculizumab könnte nicht nur zu einer Reduktion der Morbidität und Mortalität, sondern auch zu einer Reduktion der Therapiekosten führen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Araten DJ, Nafa K, Pakdeesuwan K et al. (1999) Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals. *Proc Natl Acad Sci USA*.96:5209-14.
2. Araten DJ, Swirsky D, Karadimitris A et al. (2001) Cytogenetic and morphological abnormalities in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 115:360-8.
3. Auditore JV, Hartmann RC. (1959) Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. II. Erythrocyte acetylcholinesterase defect. *Am J Med*. 27:401-10.
4. Bemba M, Guardiola P, Garderet L et al. (1999) Bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 105:366-8.
5. Bessler M, Mason PJ, Hillmen P et al. (1994a) Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the PIG-A gene. *EMBO J*.13:110-7.
6. Bessler M, Hillmen P, Longo L et al. (1994b) Genomic organization of the X-linked gene (PIG-A) that is mutated in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and of a related autosomal pseudogene mapped to 12q21. *Hum Mol Genet*.3:751-7.
7. Boschetti C, Fermo E, Bianchi P et al. (2004) Clinical and molecular aspects of 23 patients affected by paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol*.77:36-44
8. Brodsky RA, Mukhina GL, Nelson KL et al. (1999). Resistance of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells to the glycosylphosphatidylinositol-binding toxin aerolysin. *Blood* 93:1749-56.
9. Brodsky RA, Mukhina GL, Li S et al. (2000) Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am J Clin Pathol*.114:459-66.
10. Brodsky RA, Hu R. (2006) PIG-A mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and in normal hematopoiesis. *Leuk Lymphoma* 47:1215-21.
11. Brodsky RA, Young NS, Antonioli E et al. (2008) Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 111:1840-7.
12. Brubaker LH, Essig LJ, Mengel CE. (1977) Neutrophil life span in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 50:657-662.
13. Catani MV, Bernassola F, Rossi A et al. (1998) Inhibition of clotting factor XIII activity by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*. 249:275-8.
14. Clark DA, Butler SA, Braren V et al. (1981) The kidneys in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 57:83-9.
15. Dacie JV, Lewis SM. (1961) Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: variation in clinical severity and association with bone-marrow hypoplasia. *Br J Haematol*.7:442-57.
16. Dacie JV, Lewis SM. (1972) Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: clinical manifestations, haematology, and nature of the disease. *Ser Haematol*. 5:3-23.
17. Dacie J. (1980) Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Sangre (Barc)* 25:890-5.
18. Davies A, Simmons DL, Hale G et al. (1989) CD59, an LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. *Exp Med*. 170:637-54.
19. Devine DV, Gluck WL, Rosse WF et al. (1987) Acute myeloblastic leukemia in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Evidence of evolution from the abnormal paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone. *J Clin Invest*. 79:314-7.

20. Dmytrijuk A, Robie-Suh K, Cohen MH et al. (2008) FDA report: eculizumab (Soliris) for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Oncologist* 13:993-1000.
21. Dunn DE, Tanawattanacharoen P, Boccuni P et al. (1999) Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure syndromes. *Ann Intern Med*.131:401-8.
22. Endo M, Ware RE, Vreeke et al. (1996) Identification and characterization of an inherited mutation of PIG-A in a patient with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 93:590-3.
23. Fieni S, Bonfanti L, Gramellini D et al. (2006) Clinical management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in pregnancy: a case report and updated review. *Obstet Gynecol Surv*.61:593-601.
24. Fujioka S, Yamada T. (1992): Longer in vivo survival of CD59- and decay-accelerating factor-almost normal positive and partly positive erythrocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria as compared with negative erythrocytes: A demonstration by differential centrifugation and flow cytometry. *Blood* 79:1842-5.
25. Graham DL, Gastineau DA. (1992) Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria as a marker for clonal myelopathy. *Am J Med*.93:671-4.
26. Gralnick HR, Vail M, McKeown LP et al. (1995) Activated platelets in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*.91:697-702.
27. Griffith JF, Mahmoud AE, Cooper S et al. (1996) Radiological intervention in Budd-Chiari syndrome: techniques and outcome in 18 patients. *Clin Radiol*. 51:775-84.
28. Hall C, Richards S, Hillmen P. (2003) Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 102:3587-91.
29. Hall SE, Rosse WF. (1996) The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 87(12):5332-40.
30. Ham TH, Dingle JH. (1938) Studies on destruction of red cells. II chronic haemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: certain immunological aspects of the haemolytic mechanism with special reference to serum complement. *J.Clin.Invest*. 18:657.
31. Harris JW, Kosick R, Lazarus HM et al. (1999) Leukemia arising out of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Leuk Lymphoma* 32:401-26.
32. Hartmann RC, Jenkins DE. (1965) Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: current concepts of certain pathophysiologic features. *Blood* 25:850-65.
33. Hartmann RC, Jenkins DE Jr, McKee LC et al. (1966) Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: clinical and laboratory studies relating to iron metabolism and therapy with androgen and iron. *Medicine* 45:331-63.
34. Hill A, Hillmen P, Richards SJ et al. (2005a) Sustained response and long-term safety of eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 106:2559-65.
35. Hill A, Rother RP, Hillmen P (2005b) Improvement in the symptoms of smooth muscle dystonia during eculizumab therapy in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*. 90: ECR4.
36. Hill A, Ridley SH, Esser D et al. (2006) Protection of erythrocytes from human complement-mediated lysis by membrane-targeted recombinant soluble CD59: a new approach to PNH therapy. *Blood* 107:2131-7.
37. Hill A, Richards SJ, Hillmen P. (2007) Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*.137:181-92.
38. Hill A, Rother RP, Wang X, et al. (2010) Effect of eculizumab on haemolysis-associated nitric oxide depletion, dyspnoea, and measures of pulmonary hypertension in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 149:414-25.

39. Hillmen P, Bessler M, Mason PJ et al. (1993) Specific defect in N-acetylglucosamine incorporation in the biosynthesis of the glycosylphosphatidyl- inositol anchor in cloned cell lines from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5272-6.
40. Hillmen P, Lewis SM, Bessler M et al. (1995) Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*.333:1253-8.
41. Hillmen P, Hall C, Marsh JC et al. (2004) Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Eng J Med* 350:552-9.
42. Hillmen P, Young NS, Schubert J et al. (2006) The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 355:1233-43.
43. Hillmen P, Muus P, Dührsen U et al. (2007) Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 110:4123-8.
44. Hillmen P, Elebute M, Kelly R et al. (2010) Long-term effect of the complement inhibitor eculizumab on kidney function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria *Am J Hematol*. 85:551-2.
45. Holguin MH, Wilcox LA, Bernshaw NJ et al. (1989) Relationship between the membrane inhibitor of reactive lysis and the erythrocyte phenotypes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest*. 84:1387-94.
46. Holguin MH, Martin CB, Bernshaw NJ et al. (1992) Analysis of the effects of activation of the alternative pathway of complement on erythrocytes with an isolated deficiency of decay accelerating factor. *J Immunol*.148:498-502.
47. Hong Y, Ohishi K, Inoue N et al. (1997) Structures and chromosomal localizations of the glycosylphosphatidylinositol synthesis gene PIGC and its pseudogene PIGCP1. *Genomics* 44:347-9.
48. Hu R, Mukhina GL, Piantadosi S et al. (2005) PIG-A mutations in normal hematopoiesis. *Blood* 105:3848-54.
49. Hugel B, Socié G, Vu T et al. (1999) Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood* 93:3451-6.
50. Iida Y, Takeda J, Miyata T et al. (1994) Characterization of genomic PIG-A gene: a gene for glycosylphosphatidyl- inositol-anchor biosynthesis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 83:3126-31.
51. Inoue N, Izui-Sarumaru T, Murakami Y et al. (2006)Molecular basis of clonal expansion of hematopoiesis in 2 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 108:4232-6.
52. Issaragrisil S, Pankajagum A, Tang-naitrisorana Y. (1987) Corticosteroids therapy in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol*. 25:77-83.
53. Iwamoto N, Kawaguchi T, Nagakura S et al. (1995) *Blood*. 85:2228-32.
54. Iwanaga M, Furukawa K, Amenomori T et al. (1998) Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria clones in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 102:465-74.
55. Jasinski M, Pantazopoulos P, Rother RP et al. (2004) A novel mechanism of complement independent clearance of red cells deficient in glycosil phosphatidylinositol-linked proteins. *Blood* 103:2827-34.
56. Kaplan M. (2002) Eculizumab (Alexion). *Curr Opin Investig Drugs*. 3:1017-23.
57. Kavanagh D, Goodship TH. (2010) Atypical hemolytic uremic syndrome. *Curr Opin Hematol*. 17:432-8.

58. Keller P, Tremml G, Rosti V et al. (1999) X inactivation and somatic cell selection rescue female mice carrying a Piga-null mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:7479-83.
59. Kelly R, Arnold L, Richards S et al. (2010) The management of pregnancy in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria on long term eculizumab. *Br J Haematol*. 149:446-50.
60. Kinoshita T, Medof ME, Silber R et al. (1985) Distribution of decay-accelerating factor in the peripheral blood of normal individuals and patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Exp Med*. 162:75-92.
61. Lee JL, Lee JH, Lee JH et al. (2003) Allogeneic hematopoietic cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Eur J Haematol*. 71:114-8.
62. Lewis SM, Dacie JV. (1967) The aplastic anaemia-paroxysmal nocturnal haemoglobinuria syndrome. *Br J Haematol*. 13:236-51.
63. Li Q, Zhang Z, Lu Z. (1999) Remnant abnormal clonal hematopoiesis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria of clinical remission. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 20:183-6.
64. Liebman HA, Feinstein DI. (2003) Thrombosis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria is associated with markedly elevated plasma levels of leukocyte-derived tissue factor. *Thromb Res*. 111:235-8.
65. Luzzatto L, Bessler M, Rotoli B. (1997) Somatic mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a blessing in disguise? *Cell* 88:1-4.
66. Lyakisheva A, Felda O, Ganser A et al. (2002) Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Differential gene expression of EGR-1 and TAXREB107. *Exp Hematol*. 30:18-25.
67. Marchiafava E, Nazari A. (1911) Nuovo contributo allo studio degli itteri cronici emolitici. *Policlinico (sez. Med.)* 18:241.
68. Matis LA, Rollins SA. (1995) Complement-specific antibodies: designing novel anti-inflammatories. *Nat Med*. 1:839-42.
69. McMullin MF, Hillmen P, Jackson J et al. (1994) Tissue plasminogen activator for hepatic vein thrombosis in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *J Intern Med*. 235:85-9.
70. Meletis J, Terpos E, Samarkos M, Meletis C et al. (2002) Detection of CD55- and/or CD59-deficient red cell populations in patients with plasma cell dyscrasias. *Int J Hematol*. 75:40-4.
71. Metz J, Bradlow BA, Lewis SM et al. (1960) The acetylcholinesterase activity of the erythrocytes in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria in relation to the severity of the disease *Br J Haematol*. 6:372-80.
72. Miyata T, Yamada N, Iida Y et al. (1994) Abnormalities of PIG-A transcripts in granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 330:249-55.
73. Mooraki A, Boroumand B, Mohammad Zadeh F et al. (1998) Acute reversible renal failure in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Clin Nephrol*. 50:255-7.
74. Moyo VM, Mukhina GL, Garrett ES et al. (2004) Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays. *Br J Haematol*. 126: 133-8.
75. Mukhina GL, Buckley JT, Barber JP et al. (2001) Multilineage glycosylphosphatidylinositol anchor-deficient haematopoiesis in untreated aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 115:476-82.
76. Nakakuma H. (1996a) Mechanism of intravascular hemolysis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Am J Hematol*. 53:22-9.
77. Nakakuma H, Kawaguchi T. (1996b) Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): mechanism of intravascular hemolysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 24:213-29.

78. Nicholson-Weller A, March JP, Rosenfeld SI et al. (1983) Affected erythrocytes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are deficient in the complement regulatory protein, decay accelerating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:5066-70.
79. Nicholson-Weller A, Spicer DB, Austen KF. (1985) Deficiency of the complement regulatory protein, "decay-accelerating factor," on membranes of granulocytes, monocytes, and platelets in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med.* 312:1091-7.
80. Ninomiya H, Hasegawa Y, Nagasawa T et al. (1997) Excess soluble urokinase-type plasminogen activator receptor in the plasma of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria inhibits cell-associated fibrinolytic activity. *Int J Hematol.* 65:285-91.
81. Nishimura J, Inoue N, Wada H et al. (1997) A patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria bearing four independent PIG-A mutant clones. *Blood* 89:3470-6.
82. Nishimura J, Murakami Y, Kinoshita T (1999) Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: An acquired genetic disease. *Am J Hematol.* 62:175-82.
83. Nishimura J, Kanakura Y, Ware RE et al. (2004) Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the United States and Japan. *Medicine* 83:193-207.
84. Nissen C, Tichelli A, Gratwohl A et al. (1999) High incidence of transiently appearing complement-sensitive bone marrow precursor cells in patients with severe aplastic anemia-A possible role of high endogenous IL-2 in their suppression. *Acta Haematol.* 101:165-72.
85. Nissen C, Schubert J. (2002) Seeing the good and bad in aplastic anemia: is autoimmunity in AA dysregulated or antineoplastic? *Hematol J.* 3:169-75.
86. Olson JS, Foley EW, Rogge C et al. (2004) No scavenging and the hypertensive effect of hemoglobin-based blood substitutes. *Free Radic Biol Med.* 36:685-97.
87. Ostendorf T, Schubert J, Schmidt RE. (1994) Mutations in the PIG-A gene lead to GPI-deficiency in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Immun Infekt.* 22:154-5.
88. Ostendorf T, Nischán C, Schubert J et al. (1995) Heterogeneous PIG-A mutations in different cell lineages in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 85:1640-6.
89. Pakdeesuwan K, Muangsup W, Pratyá YU et al. (2001) *Int J Hematol.* 73:64-70.
90. Pangburn MK, Schreiber RD, Müller-Eberhard HJ. (1983) Deficiency of an erythrocyte membrane protein with complement regulatory activity in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80(17):5430-4.
91. Parker C, Omine M, Richards S et al. (2005) Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 106:3699-709.
92. Parker CJ. (2002) Historical aspects of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: 'defining the disease'. *Br J Haematol.* 117:3-22.
93. Parker CJ. (2007) The pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol.* 35:523-33.
94. Parker C. (2009) Eculizumab for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Lancet* 373:759-67.
95. Piedras J, López-Karpovitch X. (2000) Flow cytometric analysis of glycosylphosphatidyl-inositol-anchored proteins to assess paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone size. *Cytometry* 42:234-8.
96. de Planque MM, Bacigalupo A, Würsch A et al. (1989) Long-term follow-up of severe aplastic anaemia patients treated with antithymocyte globulin. Severe Aplastic Anaemia Working Party of the European Cooperative Group for Bone Marrow Transplantation (EBMT). *Br J Haematol.* 73:121-6.



97. Plesner T, Behrendt N, Ploug M. (1997) Structure, function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR. *Stem cells* 15:398-408.
98. Purow DB, Howard TA, Marcus SJ et al. (1999) Genetic instability and the etiology of somatic PIG-A mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood Cells Mol Dis.* 25:81-91.
99. Raiola AM, Van Lint MT, Lamparelli T et al. (2000) Bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 85:59-62.
100. Richards SJ, Rawstron AC, Hillmen P. (2000) Application of flow cytometry to the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry.* 42:223-33.
101. Richards SJ, Hill A, Hillmen P. (2007a) Recent advances in the diagnosis, monitoring and management of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom.* 72:291-8.
102. Richards SJ, Barnett D. (2007b) The role of flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the clinical laboratory. *Clin Lab Med.* 27:577-90.
103. Risitano AM, Notaro R, Marando L et al. (2009) Complement fraction 3 binding on erythrocytes as additional mechanism of disease in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients treated by eculizumab. *Blood* 113:4094-100.
104. Robak E, Robak T. (2009) Monoclonal antibodies in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Curr Drug Targets.* 10:26-37.
105. Rosse WF. (1982) Treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 60:20-3
106. Rosse WF. (1991) Dr Ham's test revisited. *Blood* 78:547-5.
107. Rosse WF. (1996) Epidemiology of PNH. *Lancet* 348:560.
108. Rosse WF, Nishimura J. (2003) Clinical manifestations of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: present state and future problems. *Int J Hematol.* 77:113-20.
109. Rosse WF, Hillmen P, Schreiber AD. (2004) Immune-mediated hemolytic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2004:48-62.
110. Rother RP, Rollins SA, Mennone J et al. (1994) Expression of recombinant transmembrane CD59 in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria B cells confers resistance to human complement *Blood* 84:2604-11.
111. Rother RP, Bell L, Hillmen P et al. (2005) The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA* 293:1653-62.
112. Rother RP, Rollins SA, Mojciak CF et al. (2007) Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat Biotechnol.* 25: 1256-64.
113. Rotoli B, Luzzatto L. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (1989). *Baillieres Clin Haematol.* 2:113-38.
114. Rouault TA, Rosse WF, Bell S et al. (1978) Differences in the terminal steps of complement lysis of normal and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 51:325-30.
115. Saso R, Marsh J, Cevreska L, Szer J et al. (1999) Bone marrow transplants for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol.* 104:392.
116. Sato S, Hasegawa Y, Nagasawa T et al. (2006) Reticulocyte-gated flow cytometric analysis of red blood cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Lab Hematol.* 12:82-5.
117. Schrezenmeier H, Hertenstein B, Wagner B et al. (1995) A pathogenetic link between aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria is suggested by a high

- frequency of aplastic anemia patients with a deficiency of phosphatidylinositol glycan anchored proteins. *Exp Hematol.*23:81-7.
118. Schrezenmeier H, Heimpel H. (1998) Diagnosis of hemolysis and differential hemolytic anemia diagnosis. *Internist* 39:1273-89.
  119. Schubert J, Alvarado M, Uciechowski P et al. (1991) Diagnosis of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using immunophenotyping of peripheral blood cells. *Br J Haematol.*79:487-92.
  120. Schubert J, Vogt HG, Zielinska-Skowronek M et al. (1994) Development of the glycosylphosphatidylinositol-anchoring defect characteristic for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in patients with aplastic anemia. *Blood* 83:2323-8.
  121. Schubert J, Hillmen P, Röth A. (2008) Eculizumab, a terminal complement inhibitor, improves anaemia in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol.*
  122. Schubert J, Schrezenmeier H, Röth A. (2009) Hämolytische Anämien. UNI-MED, 1. Auflage; Bremen, London, Boston.
  123. Seya T, Ballard LL, Bora NS et al. (1988) Distribution of membrane cofactor protein of complement on human peripheral blood cells. An altered form is found on granulocytes. *Eur J Immunol.*18:1289-94.
  124. Smith RJ, Alexander J, Barlow PN, et al. (2007) New approaches to the treatment of dense deposit disease. *J Am Soc Nephrol.* 9:2447-56.
  125. Socié G, Mary JY, de Gramont A, Rio B et al. (1996) Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. *Lancet* 348:573-7.
  126. Späth-Schwalbe E, Schrezenmeier H, Heimpel SH. (1995) Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Clinical experiences with 40 patients at one center over 25 years. *Dtsch Med Wochenschr.* 120:1027-33.
  127. Strübing P. (1882) Paroxysmale Hämoglobinurie. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 8:1.
  128. Takeda J, Miyata T, Kawagoe K et al. (1993) Deficiency of the GPI Anchor Caused by a Somatic Mutation of the PIGA Gene in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Cell* 73: 703-711.
  129. Tichelli A, Gratwohl A, Nissen C, et al. (1994) Late clonal complications in severe aplastic anemia. *Leuk Lymphoma* 12:167-75
  130. van Doorn PA. (2009) What's new in Guillain-Barré syndrome in 2007-2008? *J Peripher Nerv Syst.* 14:72-4.
  131. Ware RE, Hall SE, Rosse WF. (1991) Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with onset in childhood and adolescence. *N Engl J Med.* 325:991-6.
  132. Ware RE, Howard TA, Kamitani T et al. (1994a) Chromosomal assignment of genes involved in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis: implications for the pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 83:3753-7
  133. Ware RE, Rosse WF, Howard TA. (1994b) Mutations within the Piga gene in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 83:2418-22.
  134. Ware RE, Rosse WF, Hall SE. (1995) Immunophenotypic analysis of reticulocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 86:1586-9.
  135. Wiedmer T, Hall SE, Ortel TL et al. (1993) Complement-induced vesiculation and exposure of membrane prothrombinase sites in platelets of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 82:1192-6.
  136. Yamashina M, Ueda E, Kinoshita T et al. (1990) Inherited complete deficiency of 20-kilodalton homologous restriction factor (CD59) as a cause of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med.*323:1184-9.

137. Yonemura Y, Kawakita M, Koito A et al. (1990) Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria with coexisting deficiency of the ninth component of complement: lack of massive haemolytic attack. *Br J Haematol.* 74:108-13.
138. Young NS, Maciejewski JP, Sloan E et al. (2002) The relationship of aplastic anemia and PNH. *A. Int J Hematol.* 76 Suppl 2:168-72.
139. Young NS, Calado RT, Scheinberg P. (2006) Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood.* 108:2509-19.

## 7 Danksagungen

---

Herrn Prof. Dr. med. Pfreundschuh möchte ich für die Möglichkeit der Promotion an der Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums des Saarlandes sowie für die schnelle und kompetente Korrektur dieser Arbeit ganz herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt dem Betreuer meiner Dissertation, Herrn Prof. Dr. med. Schubert, der mir sowohl bei der Durchführung des experimentellen Teils als auch bei der schriftlichen Verfassung dieser Arbeit behilflich war. Ganz besonders bedanken möchte ich mich daneben bei den Mitarbeitern des hämatologischen Labors der Klinik für Innere Medizin I, die mich fachkundig in die Durchführung der Experimente eingewiesen haben und mir bei praktischen Fragen kompetent zur Seite standen.

Herrn PD. Dr. Gräber danke ich für die kompetente Beratung zur statistischen Auswertung meiner Daten.

Meiner Schwester Britta, meiner Freundin Henrike und meinem Mann Lutz möchte ich für die Hilfe danken.

Meinen Eltern danke ich für die immerwährende Unterstützung. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

## 8 Lebenslauf

### *Persönliche Daten*

|                     |                                       |
|---------------------|---------------------------------------|
| Name                | Anja Christina Blömer geb. Schlüter   |
| Anschrift           | Am Steinsgraben 28<br>37085 Göttingen |
| E-Mail              | anja.bloemer@med.uni-goettingen.de    |
| Geburtsdatum, -ort  | 04.07.1981, Hamm/Westf.               |
| Staatsangehörigkeit | deutsch                               |

### *Ausbildung*

|                   |  |
|-------------------|--|
| 1987 - 2000       | Besuch der Grundschule und des Gymnasiums in Hamm  |
| 08/1997 - 01/1998 | Schüleraustausch in den USA  |
| 10/2000           | Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar |
| 08/2002           | Ärztliche Vorprüfung   |
| 09/2002 – 07/2003 | Studium an der Universidad de Valencia, Spanien  |
| 03/2003           | Erstes Staatsexamen nach alter AO  |
| 04 - 06/2007      | Zweites Staatsexamen nach neuer AO   |

### *Praktische Erfahrungen*

#### **Famulaturen**

|          |   |
|----------|---|
| 08/2003  | Gastroenterologie des St. Marienhospitals in Hamm   |
| 09/2003  | Allgemeinmedizinpraxis in Emstek  |
| 08/ 2004 | Frauenklinik in Prien am Chiemsee   |
| 03/2005  | Klinik für Onkologie, Hämatologie, Immunologie und Rheumatologie des Universitätsklinikums des Saarlandes |

## Praktisches Jahr

|                   |  |
|-------------------|--|
| 08/2005 – 12/2005 | Klinik für Onkologie, Hämatologie, Immunologie und Rheumatologie und Klinik für Gastroenterologie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg/Saar |
| 12/2005 – 03/2006 | Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie der medizinischen Fakultät der Universidad Autónoma de Querétaro in Querétaro/Mexiko                           |
| 03/2006 – 07/2006 | Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg /Saar  |

## Sprachkenntnisse

|             |                         |
|-------------|-------------------------|
| Englisch    | sehr gute Kenntnisse    |
| Spanisch    | sehr gute Kenntnisse    |
| Französisch | grundlegende Kenntnisse |

## Stipendium

April 2002 bis Juli 2007 Stipendiatin der Grundförderung des katholischen Begabtenförderungswerkes Cusanuswerk

## Beruflicher Werdegang

Seit November 2007 Assistenzärztin in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Universitätsmedizin Göttingen

## 9 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

### 9.1 Tabellenverzeichnis

| <b>Tabelle</b>   | <b>Seite</b> |
|--|--------------|
| Tab. 1. Reagenzien   | 22           |
| Tab. 2. Verbrauchsmaterialien  | 22           |
| Tab. 3. Geräte   | 22           |
| Tab. 4. Antikörper   | 23           |
| Tab. 5. Pipettierschema zur Granulozytenfärbung  | 30           |
| Tab. 6. Pipettierschema zur Erythrozytenfärbung  | 31           |
| Tab. 7. Pipettierschema zur Retikulozytenfärbung   | 32           |
| Tab. 8. Einstellungen des Durchflusszytometers bei den Erythrozyten- und Granulozytenmessungen             | 33           |
| Tab. 9. Einstellungen des Durchflusszytometers bei den Retikulozytenmessungen                              | 33           |
| Tab. 10. Bestimmung der Standardlaborparameter   | 37           |
| Tab. 11. Entwicklung der GPI-defizienten Erythrozyten der einzelnen PNH-Patienten unter Eculizumabtherapie | 41           |
| Tab. 12. Entwicklung der GPI-defizienten Erythrozyten unter Eculizumabtherapie                             | 41           |
| Tab. 13. Entwicklung der GPI-defizienten Granulozyten unter Eculizumabtherapie                             | 43           |
| Tab. 14. Entwicklung der GPI-defizienten Retikulozyten unter Eculizumabtherapie                            | 48           |
| Tab. 15. Entwicklung der absoluten Retikulozytenwerte unter Eculizumabtherapie                             | 51           |
| Tab. 16. Entwicklung der LDH-Werte unter Eculizumabtherapie  | 53           |
| Tab. 17. Entwicklung des Gesamtbilirubins unter Eculizumabtherapie   | 54           |
| Tab. 18. Entwicklung der Hb-Werte unter Eculizumabtherapie   | 57           |
| Tab. 19. Prozentuale Entwicklung der Hb-Werte unter Eculizumabtherapie                                     | 57           |
| Tab. 20. Transfusionshäufigkeit vor und unter Eculizumabtherapie   | 59           |

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

| Abbildung   | Seite |
|---|-------|
| Abb. 1. Der Aufbau des GPI-Ankers   | 11    |
| Abb. 2. Therapeutischer Angriffspunkt von Eculizumab  | 21    |
| Abb. 3. Prinzip der Durchflusszytometrie  | 30    |
| Abb. 4. Durchflusszytometrische Analysen von CD59-positiven und negativen Granulozyten  | 34    |
| Abb. 5. Durchflusszytometrische Analysen von CD59-positiven und negativen Erythrozyten  | 35    |
| Abb. 6. Durchflusszytometrische Analysen von CD59-positiven und negativen Retikulozyten   | 36    |
| Abb. 7. Entwicklung der GPI-defizienten Erythrozyten unter Eculizumabtherapie   | 40    |
| Abb. 8. Entwicklung der GPI-defizienten Granulozyten unter Eculizumabtherapie   | 43    |
| Abb. 9. Entwicklung der GPI-defizienten Erythrozyten und der GPI-defizienten Granulozyten unter Eculizumabtherapie im direkten Vergleich                                | 45    |
| Abb. 10. Entwicklung der GPI-defizienten Retikulozyten unter Eculizumabtherapie   | 47    |
| Abb. 11. Entwicklung der GPI-defizienten Erythrozyten und der GPI-defizienten Retikulozyten unter Eculizumabtherapie im direkten Vergleich                              | 47    |
| Abb. 12. Entwicklung der absoluten Retikulozytenwerte unter Eculizumabtherapie  | 50    |
| Abb. 13. Entwicklung der LDH-Werte unter Eculizumabtherapie   | 52    |
| Abb. 14. Entwicklung des Gesamtbilirubins unter Eculizumabtherapie  | 54    |
| Abb. 15. Entwicklung der Hb-Werte unter Eculizumabtherapie  | 56    |
| Abb. 16. Durchschnittliche Transfusionsrate (EKs/Patient/Jahr) von sieben PNH-Patienten (Pat 1-7) während des Jahres vor und des ersten Jahres unter Eculizumabtherapie | 58    |